

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weißenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Östron,
Östradiol-17 β und Progesteron in verschiedenen Geweben
vom Kalb und deren Anwendung im Rahmen von
Rückstandsuntersuchungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Karl Hans Heinritzi
aus Freising

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. H. Karg

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Kreuzer



Tag der Promotion: 26. Juli 1974

12. 12. 1947

Seite 1

1. Persönliche Angaben

2. Familienstand

2.1. Heiratet mit der Ehefrau, geb. [Name],
[Geburtsdatum] in [Geburtsort].

Meiner Mutter

2.2. Charles [Name]

2.3. [Name]

2.4. [Name]

3. Ausbildung

3.1. [Name]

3.2. [Name]

3.3. [Name]

3.4. [Name]

3.5. [Name]

4. Beruf

4.1. [Name]

4.2. [Name]

4.3. [Name]

4.4. [Name]

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorbemerkung	1
2. Literaturteil	2
2.1. Überblick über die chemische Struktur, die Biosynthese und den Stoffwechsel von endogenen Östrogenen und Gestagenen beim Rind	2
2.1.1. Chemische Struktur	2
2.1.2. Biosynthese	5
2.1.3. Stoffwechsel	7
2.2. Physiologische Wirkungen von Östrogenen und und Gestagenen im Säugetierorganismus	11
2.2.1. Wirkungen im Fortpflanzungsgeschehen	11
2.2.2. Extragenitale Stoffwechselfunktionen	13
2.2.3. Definition der Östrogenen und gestagenen Wirkung	16
2.3. Einsatz von Östrogenen und Gestagenen in der Tiermast	17
2.3.1. Theoretische Aspekte der hormonellen Tiermast	17
2.3.2. Einteilung der Östrogene und Gestagene ..	18

2.3.2.1. Steroidverbindungen, die den körpereigenen entsprechen	19
2.3.2.2. Verbindungen steroidaler Natur, die nicht den körpereigenen entsprechen	20
2.3.2.3. Stilbene	21
2.3.2.4. Phyto- und Mykoöstrogene nicht steroidaler Natur	23
2.3.3. Bedeutung der chemischen Struktur für die Verstoffwechselung und die hormonelle Wirksamkeit der einzelnen Verbindungsklassen	25
2.3.4. In der Praxis eingesetzte Östrogenwirksame Präparate und deren Applikationsformen beim Rind	27
2.3.4.1. Präparate, die den körpereigenen Hormonen entsprechen ..	28
2.3.4.2. Präparate, die sowohl körpereigene als auch körperfremde Wirkstoffe enthalten	28
2.3.4.3. Präparate mit körperfremden Wirkstoffen	29

	Seite
2.4. Effekte von Östrogenen und Gestagenen in der Rindermast	30
2.4.1. In der Mast von Ochsen, Färsen und Jungbullen	30
2.4.2. In der Mast von Kälbern	33
2.5. Derzeitige gesetzliche Situation in der Bundesrepublik Deutschland	36
2.6. Bisherige Untersuchungen zur Erfassung exogener und endogener Östrogene und Gestagene beim Kalb	38
3. Methodischer Teil	44
3.1. Verfahren zur Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron	44
3.1.1. Überblick über die Möglichkeiten zur Bestimmung von Östrogenen und von Progesteron in niedrigen Konzentrationsbereichen	44
3.1.2. Radioimmunologische Bestimmungsverfahren zur Messung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron	46
3.1.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Steroidbestimmung	46
3.1.2.2. Verwendete Antisera	50

	Seite
3.1.2.2.1. Antiserum zur Bestimmung von Östron	50
3.1.2.2.2. Antiserum zur Bestimmung von Östradiol-17B	53
3.1.2.2.3. Antiserum zur Bestimmung von Progesteron	55
3.1.2.3. Durchführung des Radioimmuno- tests	56
3.1.2.4. Vorbereitung der Proben für die radioimmunologische Östro- genbestimmung	60
3.1.2.4.1. Extraktion von Muskel-, Leber- und Nierengewebe..	60
3.1.2.4.2. Extraktion von Fettgewebe	67
3.1.2.4.2.1. Vorversuche	67
3.1.2.4.2.2. Endgültiger Aufarbeitungs- gang	71

3.1.2.5. Vorbereitung der Proben für die radioimmunologische Pro- gesteronbestimmung	73
3.1.2.5.1. Extraktionsgang für Muskel-, Leber- und Nierengewebe bei gleichzeitiger Östro- genbestimmung	73
3.1.2.5.2. Extraktionsgang für Muskel-, Leber- und Nierengewebe bei alleiniger Bestimmung von Progesteron	75
3.1.2.6. Berechnung der Wiederfindung ..	80
3.2. Beurteilung der angewendeten Bestimmungs- verfahren	82
3.2.1. Überprüfung der Zuverlässigkeits- kriterien	83
3.2.1.1. Spezifität	83
3.2.1.1.1. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Östroge- nen im Muskel-, Le- ber- und Nierenge- webe	85

3.2.1.1.2. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Östrogenen im Fettgewebe	88
3.2.1.1.3. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe ..	90
3.2.1.2. Empfindlichkeit	94
3.2.1.3. Genauigkeit und Reproduzier- barkeit	96
3.2.1.3.1. Wiederfindung von radioaktiv markier- tem Hormon	97
3.2.1.3.2. Wiederfindung abge- stufter Hormon- mengen	99
3.2.1.3.3. Bestimmung endoge- ner Östrogenkonzen- trationen in unter- schiedlichen Gewebs- mengen	122

3.2.1.3.4. Bestimmung von Östradiol-17 β im Muskelgewebe im Rahmen einer Quali- tätsprüfung	124
3.2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der Überprüfung der Zuverlässigkeits- kriterien	125
3.3. Versuche zur Weiterentwicklung der beschrie- benen Methoden	127
3.4. Angewandte statistische Verfahren	132
3.5. Verwendete Reagentien und Materialien	132
4. Ergebnisse der Rückstandsuntersuchungen	136
4.1. Angaben zu dem Modellversuch mit elf männ- lichen Kälbern	136
4.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung	136
4.1.2. Durchführung der Hormonbehandlung	138
4.1.3. Probengewinnung	138
4.2. Ergebnisse der Östrogenbestimmung	139
4.2.1. Muskelgewebe	139
4.2.2. Lebergewebe	142
4.2.3. Nierengewebe	145
4.2.4. Fettgewebe	148

	Seite
4.3. Ergebnisse der Progesteronbestimmung	150
4.3.1. Muskelgewebe	150
4.3.2. Lebergewebe	152
4.3.3. Nierengewebe	153
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	155
5. Diskussion	157
5.1. Diskussion der Methodik	157
5.2. Diskussion der Ergebnisse	163
5.3. Schlußfolgerungen	165
6. Zusammenfassung	170
7. Literaturverzeichnis	176
8. Tabellenanhang	210
9. Lebenslauf	236

1. V o r b e m e r k u n g

Das gesetzliche Verbot der Anwendung von Östrogenen zu Mastzwecken in der Bundesrepublik Deutschland konnte nicht bewirken, die Verbreitung Östrogenhaltiger Anabolika zu unterbinden. Was die daraus resultierenden möglichen Gefahren betrifft, so waren die bisherigen Diskussionen in der Öffentlichkeit selten frei von Emotionen und von unfundierten Aussagen, was vielfach auf mangelndes Verständnis aber auch auf Mangel an sachlicher Information (d.h. präzise Daten) zurückzuführen ist. Die Frage nach einem Rückstandsrisiko für den Verbraucher kann heute aber wissenschaftlich unter Berücksichtigung qualitativer und quantitativer Aspekte erörtert werden, wozu insbesondere die methodischen Fortschritte, d.h. Entwicklung radioimmunologischer Verfahren, in den letzten Jahren beigetragen haben.

Mit vorliegender Arbeit wurde versucht, radioimmunologische Verfahren zur Bestimmung körpereigener Östrogene und Gestagene in verschiedenen Geweben einzurichten. Nach Bestätigung der Zuverlässigkeit dieser Methoden erscheint es erstmals möglich, für dieses Teilgebiet der Hormonanwendung in der Tierproduktion eine wissenschaftliche Basis zur Beurteilung des Rückstandsrisikos zu schaffen.

2. L i t e r a t u r t e i l

2.1. Überblick über die chemische Struktur, die Biosynthese und den Stoffwechsel von endogenen Östrogenen und Gestagenen beim Rind

2.1.1. Chemische Struktur

Die Gruppe der hormonellen Steroide leitet sich in ihrer chemischen Grundstruktur einheitlich vom Steran (Cyclo-pentano-perhydro-phenantren) ab, wobei je nach Anzahl der C-Atome 3 Gruppen unterschieden werden können:

- 1) Die Östrogene, sie besitzen 18 C-Atome und haben als besonderes Charakteristikum eine phenolische Struktur im A-Ring.
- 2) Die Androgene, sie weisen 19 C-Atome auf und
- 3) die Gestagene und Corticoide mit jeweils 21 C-Atomen.

Die Durchnummerierung der C-Atome im Steroidgerüst, sowie die Bezeichnung der 4 das Molekül bildenden Ringe, ist auf Abb. 1 am Beispiel des Östradiol-17 β dargestellt.

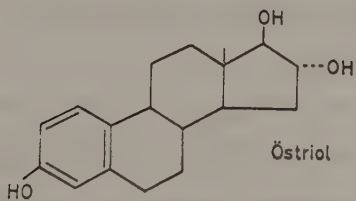
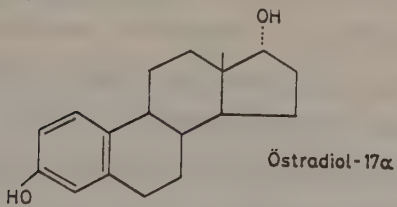
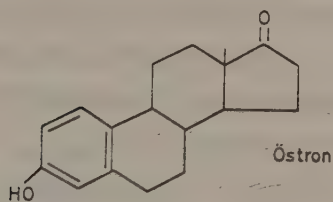
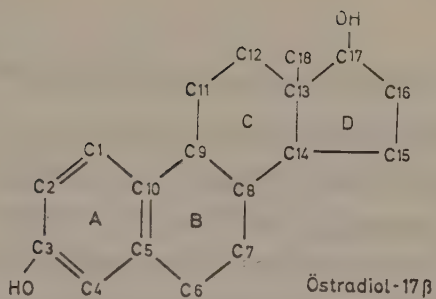


Abb. 1 Endogene Östrogene

Die körpereigenen Steroidöstrogene unterscheiden sich untereinander lediglich durch die Zahl und Anordnung der funktionellen Gruppen (Keto- und Hydroxylgruppen) speziell im D-Ring. Die wichtigsten Östrogene sind in der Reihenfolge ihrer biologischen Wirksamkeit nach: Östradiol-17 β , Östron, Östradiol-17 α und Östriol.

Die Strukturformeln der genannten Östrogene sind aus Abb. 1 ersichtlich (Karlson 1970).

Bei den endogenen Gestagenen ist die biologisch wichtigste Verbindung das Progesteron. Das Molekül ist, wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, durch jeweils eine Ketogruppe am Kohlenstoffatom C-3 und C-20, sowie durch eine Doppelbindung im A-Ring, von C-4 nach C-5 ausgezeichnet (Karlson 1970).

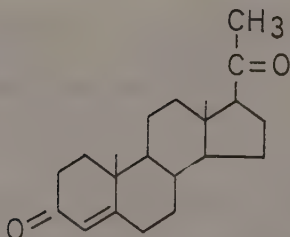


Abb. 2 Progesteron

2.1.2. Biosynthese

Für die Biosynthese der Östrogene und Gestagene, die beim weiblichen Säugetier im wesentlichen im Ovar stattfindet, ist das aktivierte Acetyl-CoA Ausgangsstufe. Über die Zwischenstufen Mevalonsäure, Squalen und Lanosterin wird das Cholesterin gebildet, woraus nach oxydativer Verkürzung der Seitenkette an C-20 und Hydroxylierung das Pregnenolon gebildet wird (Karlson 1970). Von hier ab gibt es zwei verschiedene Stoffwechselwege, wie aus Abb. 3 zu ersehen ist.

Der bevorzugte Syntheseweg läuft über Progesteron 17a-Hydroxyprogesteron, Androstendion, woraus über Östron schließlich Östradiol-17ß gebildet wird. Man spricht hier allgemein vom sogenannten Δ^4 Syntheseweg, ausgehend von der Tatsache, daß alle durchlaufenden Zwischenstufen einen ungesättigten A-Ring mit einer Doppelbindung von C-4 nach C-5 haben (Short 1962).

Der zweite mögliche Syntheseweg verläuft über 17a-OH-Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron, mit Einmündung in den Δ^4 Syntheseweg bei Androstendion. Dieser Weg wird auch Δ^5 Syntheseweg genannt, weil hier die Zwischenstufen einen ungesättigten B-Ring

mit einer Doppelbindung von C-5 nach C-6 haben.

Beide Synthesewege wurden umfassend von Abraham und Tait (1971) dargestellt.

Die zentrale Stellung von Progesteron als biologische Schlüsselsubstanz ist ebenfalls auf Abb. 3 zu erkennen. Lediglich im Corpus luteum und bei einigen Spezies auch in der Placenta, z.B. beim Mensch (Diczfalusy 1952; Pearlman und Cerceo 1952), Schaf (Short und Moore 1959) und Pferd (Short 1957, 1960), kann Progesteron als das Endprodukt der Steroidhormonbiosynthese angesehen werden.

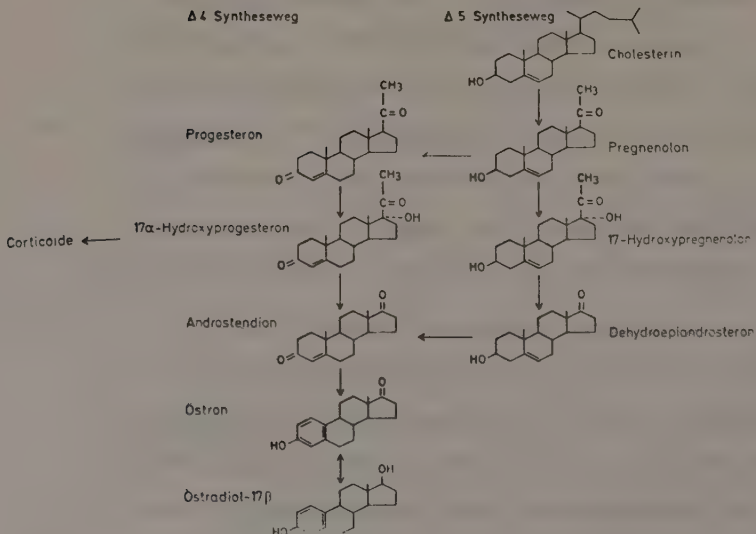


Abb. 3 Biosynthese von Progesteron und den Östrogenen
(nach Abraham und Tait 1971)

2.1.3. Stoffwechsel

Nach der Abgabe in die Blutbahn sind, wie Roberts und Szego (1946, 1953, 1955) und Szego und Roberts (1946, 1953) feststellen konnten, etwa $\frac{2}{3}$ der im Blut vorhandenen Östrogene mit Plasmaproteinen assoziiert. Auch die Bindung von Progesteron an solche Plasmaproteine wurde beschrieben (Milgrom und Baulieu 1970a, 1970b). Dieser stets reversiblen Bindung an Plasmaproteine kommt neben einer Vehikelfunktion, wobei insbesondere die Albumine betroffen sind, auch eine spezifische biologische Bedeutung zu.

Als ein Plasmaprotein, das spezielle Östrogene bindet, wurde das sogenannte SBP (Sex-Steroid-Binding-Plasma-Protein) beschrieben (Murphy 1968, Mercier-Bodard et al. 1970). Ein entsprechendes Plasmaprotein, das seinerseits spezifisch Glucocorticoide und Progesteron bindet, ist das sogenannte Transcortin bzw. CBG (Corticosteroid-bindendes Globulin) (Daughaday 1958a, 1958b; Slaunwhite und Sandberg 1959; Doe et al. 1960).

Im Gegensatz zum Albumin, das bei einer höheren Bindungskapazität eine niedrige Assoziation zu den Steroidhormonen aufweist, weisen diese Globuline bei einer hohen Assoziationskonstante eine relativ niedrige Bindungskapazität auf.

Die Bereitstellung dieser spezifischen Plasmaproteine (SBP und CBG) ist allgemein von physiologischen Zuständen abhängig. So ist z.B. im letzten Drittel der Gravidität oder aber auch nach Östrogenbehandlungen die Konzentration von SBP im Blut erhöht (Barlow et al. 1969; Westphal 1971).

Auch für CBG gilt, daß die Konzentration dieses Proteins von physiologischen und pathologischen Zuständen (Alter, Geschlecht, Gravidität) sowie von Therapien abhängig ist (Westphal 1971).

Grundsätzlich kann gesagt werden, daß das Vorkommen dieser spezifischen Plasmaproteine und deren Bindungseigenschaften speziesspezifischen Unterschieden unterliegen.

Speziell für den Stoffwechsel von Progesteron konnte Billiar et al. (1969) aufzeigen, daß im "in vitro"-Ansatz Progesteron bei Anwesenheit von Human-CBG und Human-Serum-Albumin von 20 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase enzymatisch nicht angegriffen werden konnte.

Ebenso erwies sich an Protein gebundenes Progesteron im biologischen Mäuseuterustest als wirkungslos (Westphal und Forbes 1963; W. Hoffmann et al. 1969).

Ähnliche Gegebenheiten müssen auch für an SBP-gebundene Östrogene angenommen werden.

Durch die Bindung des Steroids an das Protein kommt es also einmal zu einer Verminderung der Aktivität des Steroidhormons, gleichzeitig wird aber das Steroidhormon seinerseits im Organismus vor der Adsorption an Oberflächenstrukturen und auch vor enzymatischen Abbauvorgängen, besonders in der Leber, geschützt. Der Steroid-Protein-Komplex stellt aber auch eine ungefährliche Form eines Hormonreservoirs dar (die Bindung ist ja reversibel), in dem auch verhältnismäßig große Hormonmengen gespeichert werden können, ohne biologische Wirkungen zu entfalten (Westphal 1971).

Abbau und Ausscheidung der Östrogene im Organismus erfolgen einmal durch Inaktivierung der biologisch hoch aktiven Östrogene (Östradiol-17 β) in weniger aktive Formen, z.B. in Östradiol-17 α beim Rind (Mellin et al. 1965, Mellin und Erb 1965, 1966) und zum anderen auch durch Veresterung in der Leber mit Glucuronsäure und Sulfatresten, wonach sie in wasserlöslicher Form vorliegen und schnell über Faeces und Urin ausgeschieden werden können (Ganong 1965, El Attar und Turner 1957).

Ähnlich wie beim Menschen (Adlercreutz 1974) dürfte auch beim Rind ein "enterohepatischer Kreislauf" in diese Ausscheidungsvorgänge mit eingeschlossen sein, da in der Gallenflüssigkeit sowohl Östron als auch Östradiol-17a (Pearlman et al. 1947, Adlercreutz und Luukainen 1965a, 1965b, Rommel und Zschintzsch 1965) nachgewiesen werden konnten und die Ausscheidung via Faeces als Hauptroute anzusehen ist (El Attar und Turner 1957, Mellin und Erb 1966).

Die Inaktivierung des Progesterons findet hauptsächlich in der Leber statt und wird im wesentlichen durch Reduktion der C-3 und C-20 Ketogruppen bzw. Hydrierung des A-Ringes erreicht (Hayano et al. 1956).

Die Ausscheidung der Abbauprodukte erfolgt zum größten Teil über die Niere, bei der Frau normalerweise als Pregnandiolglucuronid (Klopper 1956). Im Rinderharn wurde von Haraszti et al. (1968) 5 β -Pregnan-3a, 20a-diol als Hauptprodukt des Progesteronstoffwechsels isoliert und eine Abhängigkeit der Ausscheidungsmengen vom Zyklusstadium beobachtet.

2.2. Physiologische Wirkungen von Östrogenen und Gestagenen im Säugetierorganismus

2.2.1. Wirkungen im Fortpflanzungsgeschehen

Für die direkte Wirkung von Östrogenen an bestimmten Organen ist das Vorhandensein Östrogenbindender Zell-Rezeptor-Proteine entscheidend (Jungblut et al. 1969, Korenmann 1970, Korenmann und Duke 1970, Sutherland 1972). Diese Rezeptorproteine können aus den Erfolgsorganen, z.B. dem Uterus, isoliert werden. Hechter und Soifer (1971) nehmen als Rezeptorwirkung an, daß die Rezeptoren durch die aktive Auswahl des Hormons und die selektive Bindung des Steroids zu einer Akkumulation des Hormons innerhalb der Zelle führen. Der mobile "Steroid-Rezeptor-Komplex" transportiert das Steroid innerhalb der Zelle zum Zellkern, wo es sich als nuklearer Komplex durch Bindung an ein Zellkernprotein den "Neo-Rezeptor" oder "Akzeptor" anreichert. Innerhalb des Zellkerns wirkt das Steroid (in freier Form oder als Komplex) auf ein oder mehrere Kontrollelemente, welche die Genformierung und -aktivität regulieren und somit können dann bestimmte Arten von RNS (Messenger-RNS) aus dem Kern heraus in das Cytoplasma eindringen, welche die Synthese neuer Proteine anregen, letztlich als die hormonale Wirkung bezeichnet.

Auch für Progesteron wurden Rezeptoren im Uterus, in der Vagina und in der Cervix gefunden, deren Regulation beim Meerschweinchen (siehe bei Milgrom et al. 1972a, 1972b) von den Östrogenen abhängig ist. Bei der Ratte, der Maus und dem Kaninchen wurde bestätigt (Feil et al. 1972, Wiest und Rao 1972; Faber et al. 1972a, 1972b), daß die Konzentration der Progesteronrezeptoren im Uterus durch Östrogene erhöht wird (Davies und Ryan 1972).

Östrogene und Gestagene zeigen im Wechselspiel ihre direkte Wirkung in der Beeinflussung der Entwicklung und Kontrolle des morphologischen und funktionellen Zustandes des weiblichen Genitalapparates, sowie in der weiteren Ausbildung der charakteristischen sekundären Geschlechtsmerkmale (zusammenfassende Literatur dazu siehe bei Scheunert und Trautmann 1965; Kolb 1967; Briggs und Brotherton 1970; Tausk 1970).

Progesteron und Östrogene entfalten ihre biologische Wirkung einmal also direkt an den sogenannten "Erfolgsorganen", zum anderen aber auch durch den Rückkopplungsmechanismus (Feed-back-Meldungen) auf die hypothalamisch-hypophysären Regelzentren, wie aus dem in Abbildung 4 dargestellten Schema des Regelkreises des Sexualzyklus hervorgeht.

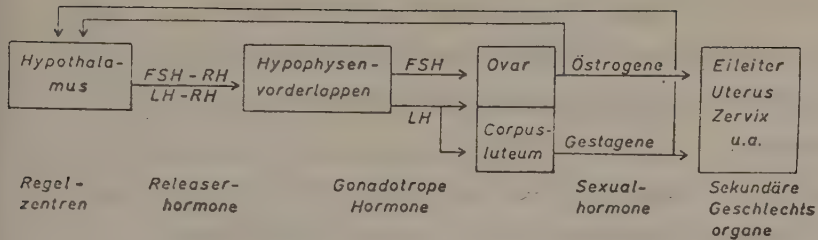


Abb. 4 Regelkreis des Sexualzyklus
(Karg 1970)

2.2.2. Extragenitale Stoffwechselfunktionen

Von diesen Funktionen sind besonders die das Wachstum beeinflussenden Eigenschaften hervorzuheben, die speziell den östrogenwirksamen Verbindungen zukommen. Vorweggenommen sei, daß diese Wirkungen stark dosisabhängig sind. Allgemein gilt, daß durch "niedrige" Dosierungen ein anaboler Effekt erzeugt wird, während zu hohe Dosierungen gerade das Gegenteil, nämlich einen katabolen Effekt, bewirken (Karg 1958). Für den katabolen Effekt der Östrogene, wenn sie eben in hoher Dosierung verabreicht werden, stellt Karg (1958) zweierlei Wirkungsbeziehungen in den Vordergrund,

nämlich einen beschleunigten Epiphysenschluß und zum anderen die Aktivierung der Nebennierenrinde durch Östrogene und zwar mit der Folge der vermehrten Produktion besonders antianabol wirkender Glucocorticoide.

Daß durch die anabole Wirkung der Östrogene, die zu einem weit verbreiteten Einsatz dieser Verbindungen in der tierischen Produktion geführt hat, eine vermehrte Proteinsynthese induziert wird und nicht etwa ein Wachstum durch Wassereinlagerungen (z.B. Thyreostatika, siehe Karg 1966) vorgetäuscht wird, wird aus den in Kapitel 2.4. zitierten Untersuchungen deutlich. Versuchsweise wurden auch gestagenwirksame Präparate, z.B. Melengöstrolacetat (Young et al. 1969; Wilson et al. 1970), auf ihre anabolen Eigenschaften überprüft. Entsprechende Effekte, wie sie für die Östrogene beobachtet wurden, traten jedoch nicht auf (Jöchle 1969).

Eine definitive Erklärung für diese anabole Wirkung, speziell der der Östrogene, kann heute noch nicht abgegeben werden; derzeit werden jedoch mehrere Theorien diskutiert. Nach der ersten Theorie wird diese Wirkung auf die Beeinflussung hypothalamischer Regelzentren zurückgeführt. So wurden im Hypothalamus nicht nur bei der Ratte (Kato und Villet 1967; Kato et al. 1971;

Kato 1973), sondern auch beim Rind (Kahwanago et al. 1969) spezifische Östrogenrezeptoren gefunden. Möglicherweise kommt es eben hier nicht nur zu einer Beeinflussung der für die Gonadotropinsekretion verantwortlichen Releaserhormone, sondern auch zu einer Beeinflussung der für die Regulation der Stoffwechselhormone (STH, ACTH) verantwortlichen Releaserhormone.

Die zweite Theorie beruht auf der in letzter Zeit gemachten Beobachtung, daß auch im Pancreas, bisher allerdings nur beim Hund, beim Pavian und beim Menschen (Sandberg et al. 1973) Östrogenrezeptoren gefunden wurden. Dies läßt eine Beeinflussung der beiden Stoffwechselhormone Glucagon und Insulin durch exogen zugeführte Östrogene möglich erscheinen. In diesem Zusammenhang muß eine Beobachtung von Landon (1974, persönliche Mitteilung an Karg) hervorgehoben werden, nach der bei Verabreichung von Anabolika die Glucagonsekretion gehemmt wird.

Eine dritte Theorie schließlich - die nicht speziell für die Östrogene, d.h. für die Sexualhormone, aufgestellt worden ist - geht auf Untersuchungen von Schole (1966) zurück und besagt, daß anabolwirksame Stoffe durch unspezifisches Eingreifen in den intermediären Zellstoffwechsel (Atmungskette) ihre Wirkung entfalten.

2.2.3. Definition der östrogenen und gestagenen Wirkung

Für die Definition der östrogenen Wirkung wurde eine spezifische biologische Wirkung herangezogen, nämlich die der Erzeugung von charakteristischen mit Brunstsymptomen einhergehenden Veränderungen an den sekundären Geschlechtsorganen beim weiblichen Individuum. Nachdem es nun gelungen ist, aus den Zellen des Endometriums einen spezifischen, uterinen, zytoplasmatischen Östrogenrezeptor zu isolieren und näher zu charakterisieren (Jensen et al. 1969), kann für die Gruppe der östrogenwirksamen Stoffe eine noch spezifischere Definition gegeben werden. Demnach handelt es sich dabei um Verbindungen, die in der Lage sind, Bindungsstellen am uterinen Östrogenrezeptor zu besetzen, wodurch dann die entsprechenden biochemischen und physiologischen Veränderungen eingeleitet werden.

Nachdem inzwischen auch für Gestagene spezifische Zellrezeptoren gefunden worden sind (siehe Kapitel 2.2.1.), könnte auch hier die Definition gegeben werden, daß es sich um Stoffe handelt, die entsprechend wie das Progesteron im "in vitro" Test eine Bindung mit diesen Rezeptoren eingehen. Solche Untersuchungen zur Charakterisierung einzelner Verbindungen müssen jedoch erst noch durchgeführt werden. Bis jetzt ist man auf

die biologische Definition angewiesen, d.h. bei Gestagenen handelt es sich um Verbindungen, die ähnlich qualitative Eigenschaften wie das wichtigste körpereigene Gestagen, das Progesteron, haben. Diese Wirkungen können z.B. in einem biologischen Test (Kaninchenuterustest nach Clauberg 1930 und Mc Phail 1935; Mausuterustest nach Hooker und Forbes 1947) überprüft werden.

2.3. Einsatz von Östrogenen und Gestagenen in der Tiermast

2.3.1. Theoretische Aspekte der hormonellen Tiermast

Für die Anwendung der Östrogene in der Tiermast war der anabole Effekt ausschlaggebend. Diese anabole Wirkung zeigt sich am deutlichsten bei kastrierten Tieren (Burroughs et al. 1954). Karg (1964) erklärt dies damit, daß durch die exogene Hormonzufuhr ein endogenes Hormondefizit (entstanden durch Entfernung der Keimdrüsen) ausgeglichen wird. Bei Jungbullen z.B. werden die Gewichtszunahmen und die Futterverwertung durch Verabreichung von Östrogenen bei weitem nicht in dem Maß verbessert, wie dies bei Ochsen der Fall ist (Klostermann et al. 1955; Brüggemann, Karg, Barth 1958).

Auch bei weiblichen geschlechtsreifen Tieren zeigen Östrogenverabreichungen weit geringere Erfolge als bei Ochsen, in manchen Fällen fehlt die Wirkung sogar ganz (Gassner et al. 1960; Bush und Reuber 1963; Wickersham und Schultz 1964).

Wie bei Ochsen treten auch anabole Effekte bei Mastkälbern auf (Andrews et al. 1956; Tiews et al. 1972; van der Wal et al. 1972; van der Wal und van Weerden 1973; van der Wal und Berende 1973). Auch hier kann zur Erklärung der anabolen Wirkung einer exogenen Östrogenzufuhr angeführt werden, daß bei den ja noch nicht geschlechtsreifen Tieren eine endogene Hormonproduktion noch nicht voll angelaufen ist. Der Effekt einer Östrogenmast ist also vom momentanen Hormonstatus des Tieres abhängig.

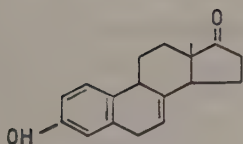
2.3.2. Einteilung der Östrogene und Gestagene

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Struktur bzw. ihrer Herkunft lassen sich die Östrogenwirksamen Stoffe in vier, die gestagenwirksamen Stoffe in zwei Verbindungsklassen einteilen.

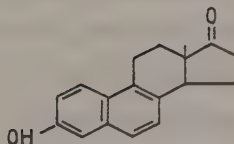
2.3.2.1. Steroidverbindungen, die den körpereigenen entsprechen

Hierzu gehören alle im Säugetierorganismus produzierten Östrogene und Gestagene. Wie in Kapitel 2.1.1. dargelegt, sind die wichtigsten Östrogene in der Reihenfolge ihrer biologischen Wirksamkeit: Östradiol-17 β , Östron, Östradiol-17 α und Östriol.

Speziell im Harn trächtiger Stuten kommen die Östrogen-wirksamen Verbindungen Equilin und Equilenin vor (Scheunert und Trautmann 1965).



EQUILIN



EQUILENIN

Vereinzelte kommen diese Verbindungen, z.B. Östriol (Skarzynski 1933) oder Östron (Butenandt und Jacobi 1933), aber auch Progesteron (Langecker und Damrosch 1968), das ja das wichtigste körpereigene Gestagen ist, im pflanzlichen Bereich vor. Die meisten dieser Verbindungen können heute fabrikationsmäßig synthetisch ohne größere Schwierigkeiten dargestellt werden.

2.3.2.2. Verbindungen steroidaler Natur, die nicht den körpereigenen entsprechen

Mit dem Ziel oral wirksame Östrogene und Gestagene darzustellen (siehe Kapitel 2.3.3.), wurde von der chemischen und pharmazeutischen Industrie eine Anzahl von Verbindungen dargestellt, bei denen, ausgehend von den körpereigenen Steroiden, Veränderungen im Molekül vorgenommen wurden. In vielen Fällen handelt es sich um Steroidester, um nur einige zu nennen:

Östradiol-benzoat

Östradiol-dipropionat

Östradiol-valerianat

Östradiol-cyclopentylpropionat

Oder es wurden Aethinylgruppen (z.B. Aethinylöstradiol) bzw. Halogenatome in das Ringsystem eingebaut (z.B. bei dem synthetischen Gestagen Melengöstrol).

Für weitere Einzelheiten sei auf die einzelnen Fachbücher verwiesen (Dorfman, Ungar 1965; Fieser, Fieser 1967; Mutschler 1973). Vollständigkeitshalber sei erwähnt, daß auch aus Pflanzen Östrogene oder Gestagenvorstufen isoliert werden konnten, die steroidaler Natur sind und nicht den körpereigenen entsprechen, z.B. Miroöstrol bzw. Diosgenin (Hammer 1965, siehe bei Junkmann 1968).

2.3.2.3. Stilbene

Als zweite östrogenwirksame Verbindungsklasse sind, neben den Steroidöstrogenen, die sogenannten Stilbene anzuführen. Es handelt sich hier um körperfremde, nicht steroidale Verbindungen. Sie wurden erstmals von Dodds et al. 1938 beschrieben. Diesem gelang es nach Veränderung des Stilbenmoleküls (= Diphenyläthylen) durch Einführung von zwei Hydroxylgruppen und durch Ersatz von zwei Wasserstoffatomen der Äthylenbrücke durch Äthylgruppen eine Verbindung darzustellen, welche die biologischen Wirkungen der endogenen Östrogene vollständig nachahmte. Nach Mutschler (1973) soll lediglich die psychische Wirkung nicht vorhanden sein. Diese neue Verbindung wurde Diäthylstilböstrol (DÄS) genannt.

Neben DÄS gibt es noch weitere Stilbenderivate mit östrogener Wirkung, wobei insbesondere Dienöstrol und Hexöstrol zu nennen sind. Die Strukturformeln von Stilbööstrol sowie der drei erwähnten Stilbenderivate sind in Abbildung 6 aufgeführt.

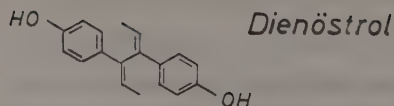
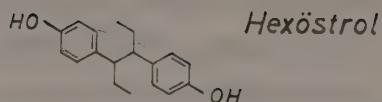
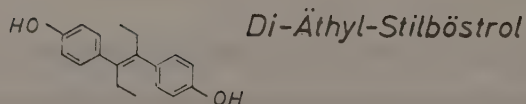
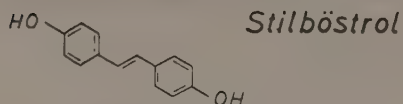


Abb. 6 Stilbenderivate

Durch Veresterung oder Verätherung der phenolischen Hydroxylgruppen kann die Wirkungsdauer von DÄS und Dienöstrol verlängert werden (Mutschler 1973).

2.3.2.4. Phyto- und Mykoöstrogene nicht steroidaler Natur

Häufiger als die Phytoöstrogene steroidaler Natur (siehe Kapitel 2.3.2.2.) sind Phytoöstrogene, die sich von den Isoflavonen oder von den Cumarinabkömmlingen ableiten. Gemeinsam mit den anderen östrogenwirksamen Verbindungen weisen auch diese Verbindungen phenolische OH-Gruppen auf.

Zu den Isoflavonen zählt das Genistein, chemisch ein 5,7,4'-tri-hydroxy-isoflavon (Curnow et al. 1948; Curnow 1954; Curnow und Rossiter 1955; Robinson 1949; Beck und Braden 1951; Bradbury und White 1951, 1954). Abkömmlinge des Genisteins sind das Biochanin A, das aus Rotklee isoliert wurde (Pope 1953; Bickoff et al. 1958; Guggolz et al. 1962; Wong 1962).

Bekanntester Cumarinabkömmling ist das Cumestrol (Bickoff et al. 1957, 1958; Bickoff 1961). Am häufigsten finden sich diese Phytoöstrogene in bestimmten Kleearten, z.B. *Trifolium subterraneum*. Die Strukturformeln der bekanntesten Vertreter (Genistein und Cumestrol) sind in Abbildung 7 dargestellt.

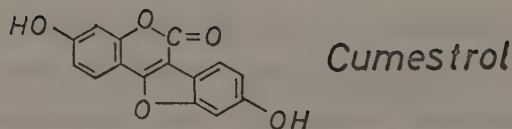
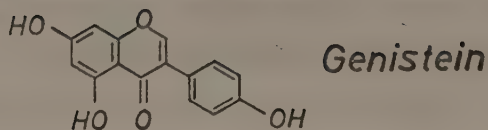


Abb. 7 Struktur der Phytoöstrogene Genistein und Cumestrol

Bei den Mykoöstrogenen ist der bekannteste Abkömmling das Zeranol. Es ist ein Resorcylsäurelacton, das synthetisch aus einem Metaboliten des Maisschimmelpilzes *Giberella zeae* hergestellt wird (Stob et al. 1962; Perry et al. 1968). In Abbildung 8 ist die Strukturformel für Zeranol dargestellt.

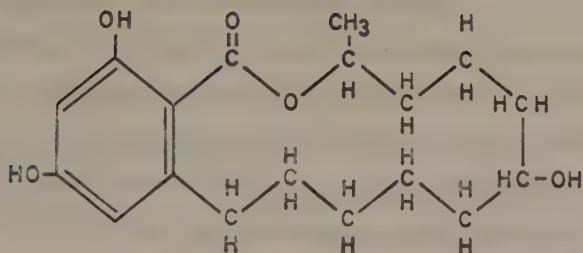


Abb. 8 Struktur des Mykoöstrogens Zeranol

2.3.3. Bedeutung der chemischen Struktur für die Verstoffwechselung und die hormonelle Wirksamkeit der einzelnen Verbindungsklassen

Für die hormonellen Verbindungen, die den körpereigenen entsprechen, sind im Organismus vorgezeichnete Stoffwechselwege gegeben.

Diese wurden in Kapitel 2.1.3. bereits ausführlich dargelegt.

Werden nun dem Säugetierorganismus exogen, den körpereigenen entsprechende Steroidöstrogene zugeführt, so werden diese Verbindungen sofort in diese Stoffwechselwege eingeführt; der Organismus unterscheidet nicht zwischen einem endogen produzierten und einem exogen zugeführten Hormon körpereigener Struktur.

Nach einer peroralen Applikation muß mit einer schnellen Inaktivierung dieser endogenen Steroidhormonverbindungen gerechnet werden, da nach Resorption aus dem Darm über den Pfortaderkreislauf diese Verbindungen sofort einer Leberpassage unterworfen werden, wobei sie durch oben beschriebene Abbauvorgänge inaktiviert werden. Diese Verbindungen, peroral zugeführt, haben deshalb eine sehr geringe biologische Wirksamkeit. Erst nach parenteraler Zufuhr, bei der die Leberpassage sekundär auf indirektem Weg erfolgt, kann mit einer größeren biologischen Wirksamkeit gerechnet werden. Anders als bei der Zufuhr von körpereigenen Östrogenen und Gestagenen liegt für zugeführte körperfremde Verbindungen mit östrogenen und gestagenen Wirksamkeit (z.B. Stilbene) keine spezifische Enzymausstattung für die Verstoffwechselung vor. Auf die relativ lange Verweildauer im Organismus macht am Beispiel des Polydiäthylstilböstrolphosphates Perklev (1964) aufmerksam. Diese Tatsache wird im wesentlichen auf einen ausgeprägten "enterohepatischen Kreislauf" zurückgeführt, worunter zu verstehen ist, daß eine Verbindung nach Absorption aus dem Darm und der Leberpassage entweder in biologisch noch aktiver Form mit der Gallenflüssigkeit wieder in das Darmlumen ausgeschieden oder dort reaktiviert wird (Hinds et al. 1965), von wo aus eine neue Absorption stattfinden kann (Glascock und Smith 1970).

Durch diesen enterohepatischen Kreislauf kann es also zu einer nachhaltigeren hormonellen Wirkung kommen. Das folgende Beispiel zeigt dies in klarer Weise: Im "in vitro" Test weist Östron eine geringgradig höhere Affinität zum uterinen zytoplasmatischen Östrogenrezeptor im Vergleich zu Dienöstrol auf. Nach peroraler Verabreichung an ovariectomierte Ratten dagegen - das Hormon gelangt also nicht direkt zum Erfolgsorgan - zeigen sich deutliche Wirkungsunterschiede (gemessen an der Gewichtszunahme des Uterus). Die Wirkung von Östron ist in diesem Testsystem deutlich schwächer als die von Dienöstrol (Huis in't Veld et al. 1971; Karg et al. 1973).

2.3.4. In der Praxis eingesetzte Östrogenwirksame Präparate und deren Applikationsformen beim Rind

Bei diesen Betrachtungen bleibt die gesetzliche Situation unberücksichtigt, es soll vielmehr von den tatsächlichen Gegebenheiten ausgegangen werden.

2.3.4.1. Präparate, die den körpereigenen Hormonen entsprechen

Ein solches im Handel befindliches Präparat besteht aus einem Gemisch von 20 mg 17 β -Östradiol plus 200 mg Progesteron für die Anwendung beim männlichen Rind bzw. aus 20 mg 17 β -Östradiol plus 200 mg Testosteron für die Anwendung beim weiblichen Rind (Handelsname V-Implix M^R bzw. V-Implix W^R). Diese zwei Präparate werden als Pellets in den Handel gebracht. Nach Angabe des Herstellers wird bei Rindern bis zu 350 kg Körpergewicht die oben beschriebene Behandlungsdosis in Form von 10 Pellets durch Implantation in das subcutane Bindegewebe des Ohrmuschelgrundes verabreicht.

2.3.4.2. Präparate, die sowohl körpereigene als auch körperfremde Wirkstoffe enthalten

Unter dem Firmennamen "Synovex-S" ist in den USA ein solches Präparat im Handel. Es enthält 200 mg Progesteron und 20 mg Östradiolbenzoat. Das Präparat wird nach Firmenangabe in den letzten 60 bis 150 Tagen der Mastperiode bei Ochsen subcutan in Form von 8 Pellets am Ohr implantiert.

Ein weiteres in diese Gruppe gehörendes Präparat ist Revalor^R; es enthält 20 mg Östradiol-17 β und als körperfremde Komponente 140 mg Trenbolonacetat. Dieses Präparat wird sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Rindern in Form von 8 Pellets zum Implantieren verwendet.

2.3.4.3. Präparate mit körperfremden Wirkstoffen

Hierzu zählt unter anderem das Präparat "Synovex-H", das wieder vornehmlich in den USA im Handel ist und als Wirkstoffe 200 mg Testosteronpropionat und 20 mg Östradiolbenzoat enthält und in Pelletform für die subcutane Implantation am Ohr beim weiblichen Rind empfohlen wird.

Die weiteste Verbreitung fand der Einsatz von Stilbenen als Masthilfsmittel. Das wohl gebräuchlichste Präparat ist das Diäthylstilböstrol (DÄS). Es wird entweder peroral ($\sim$ 10 mg/Tier/Tag) mit dem Futter über einen Zeitraum von ca. 120 Tagen bis 48 Stunden vor der Schlachtung verabreicht (Burroughs et al. 1954, 1955; Beeson et al. 1956) oder als Implantat von 24 bzw. 36 mg 120 Tage vor der Schlachtung (Dinusson et al. 1950; Clegg und Cole 1954) gegeben.

Als weiteres Stilbenpräparat kommt Hexöstrol zur Anwendung. Es wird entweder in einer Dosierung von

60 mg in Form von Pellets subcutan an der Ohrbasis 90 Tage vor der Schlachtung implantiert, oder es wird 90 Tage lang oral in einer Dosis von 10 mg pro Tier und Tag verabreicht (Kilkenny und Sutherland 1970). Außerdem kommt auch noch das Mykoöstrogen "Zeranol" (Ralgro^R) zur Anwendung. Als Dosierung wird von der Herstellerfirma 36 mg Zeranol bis zu einem Gewicht von 300 kg vorgeschlagen. Zeranol wird dabei in Form von 3 Pellets subcutan in die Ohrmuschel in Richtung auf den Ohrgrund implantiert. In den USA wird es als reines Anabolikum gehandelt; bei eben beschriebener Applikationsart und Dosierung kann eine normale Schlachtung erst nach 65 Tagen vorgenommen werden.

2.4. Effekte von Östrogenen und Gestagenen in der Rindermast

2.4.1. In der Mast von Ochsen, Färsen und Jungbullen

Die praktische Anwendung der Östrogene in der Mast von Rindern begann 1954 in den USA mit der Genehmigung durch die Food and Drug Administration das Präparat DÄS einzusetzen (siehe bei Hoffmann et al. 1974). Die Beobachtung, daß eine Implantation von 48 mg Diäthylstilböstrol eine verbesserte Mastleistung

brachte, wurde erstmals von Dinusson et al. 1950 gemacht. 1954 fanden Burroughs et al., daß eine kontinuierliche Zufuhr von 5 - 10 mg DÄS pro Tier und Tag bei einjährigen Mastochsen erhebliche Mehrzunahmen gegenüber Kontrolltieren bei gleichzeitiger Futtereinsparung erbringen konnten.

Diese Beobachtungen konnten in zahlreichen weiteren Untersuchungen bestätigt werden (Clegg und Cole 1954; Burroughs et al. 1955; Beeson et al. 1956; Brüggemann, Barth und Karg 1958; Brüggemann und Karg 1960; Karg 1966). In all diesen Versuchen wurden hauptsächlich hinsichtlich der Dosierung, der Art der Applikation und der Absetzzeit Veränderungen vorgenommen. Das Resultat waren die im vorigen Kapitel beschriebenen Applikationen. Ähnliche Aussagen lassen sich für Hexöstrol (Kilkenny und Sutherland 1970) und Dienöstrol (Stob et al. 1956) machen.

Als weiteres Präparat, das als Östrogen eingestuft werden muß (Karg 1973) und das allein verabreicht wird, ist Zeranol zu nennen (Ralgro^R) (siehe Kapitel 2.3.4.3.). Nach Angaben von Borger et al. (1973) werden damit bei Ochsen ein vermehrtes Wachstum von 7,8 % und bei Jungbullen von 5,9 % erzielt. Im Vergleich zu Ochsen war der anabole Effekt bei Färsen weniger stark ausgeprägt (Sharp 1969).

Nach einmaliger parenteraler Zufuhr von 100 mg Östradiolundecylat konnten Brüggemann, Barth, Karg (1958) keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen behandelten und den unbehandelten Jungbullen feststellen. Eine Dosis von 1000 mg Östradiolundecylat hatte bereits eine deutliche Wachstumsdepression zur Folge (siehe Kapitel 2.2.2.). In neueren Untersuchungen konnten Hale und Ray (1973) zeigen, daß auch reines Östradiol-17 β , oral gegeben, einen anabolen Effekt beim Rind zeigt. In Untersuchungen an Ochsen hatte eine Dosis von 40 mg/Tier und Tag etwa den gleichen Effekt wie 10 mg DÄS pro Tier und Tag. 10 mg Östradiol-17 β pro Tier und Tag führten zu keiner erhöhten Gewichtszunahme, hatten jedoch gegenüber den Kontrolltieren eine um 5,3 % geringere Futteraufnahme zur Folge.

Die deutliche anabole Wirkung von Östradiol-17 β und von Östradiolestern in Verbindung mit anderen Sexualhormonen konnten in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen werden (siehe bei Brüggemann, Karg, Barth 1958). Daß es sich bei diesen Gewichtszunahmen infolge einer Östrogenverabreichung um ein echtes Proteinwachstum handelt, wurde von Clegg und Cole (1954) durch N-Bilanz-Untersuchungen gezeigt. Zu ähnlichen Aussagen kamen durch die Erstellung von N-Bilanzen beim Rind

Preston et al. 1965. Lamming (1963) und Sinell (1964) führen die Gewichtszunahmen zum Teil auch auf eine Makrosplanhie, d.h. auf einen höheren Füllungszustand des Magen-Darmkanals, zurück. Ergänzende Untersuchungen bezüglich Fleischqualität machte Prändl (1964) (siehe bei Karg 1964) bei Jungbullen, die 115 Tage mit 20 mg DÄS peroral behandelt worden waren. Die gemessenen Parameter (Gehalte an Wasser, Fett, Asche, Rohproteine, Oxyprolin, Glykogen, Myoglobin, pH-Wert, Gewichtsverlust bei Lagerung, Extrahierbarkeit der fibrillären Muskel-eiweißkörper) zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe; es waren sogar die Kochverluste beim Fleisch hormonbehandelter Tiere etwas geringer.

Über den Einsatz von Gestagenen kann zusammenfassend festgestellt werden, wie bereits in Kapitel 2.2.2. angedeutet wurde, daß bei alleinigem Einsatz dieser Verbindungen kein Masterfolg zu verzeichnen ist (Jöchle 1969).

2.4.2. In der Mast von Kälbern

Untersuchungen über Effekte in der Hormonmast bei Kälbern sind noch relativ wenig publiziert worden, wahrscheinlich da die Östrogenmast in der Bundesrepublik Deutschland verboten ist (siehe Kapitel 2.5.) und

eine Kälbermast in den USA auf Grund der anderen Verzehrgeohnheiten nicht aktuell ist.

Hinsichtlich der Wirkung von DÄS, Dienöstrol und Hexöstrol in der Kälberhaltung berichten Andrews et al. 1956 über Verbesserungen in der Gewichtszunahme und im Futterverzehr gegenüber Kontrolltieren.

In 10 Versuchen mit insgesamt 563 männlichen Holstein-bullenkälbern untersuchten van der Wal und Berende (1973) verschiedene Hormonpräparate bezüglich ihrer Wirkung, die Mastleistung von Kälbern zu beeinflussen. Als Parameter für den Erfolg der Präparate wurden Futterverbrauch - Zunahme, Fleischqualität und die Gesundheit der Tiere herangezogen. Das unterschiedliche Alter der Tiere sowie deren Gewicht zum Zeitpunkt der Implantation war von größerem Einfluß als zum Beispiel eine Dosissteigerung von 25 mg auf 2 x 100 mg DÄS.

Der größte Masterfolg wurde vier Wochen nach der Implantation in der 11. bzw. 14. Woche erreicht. Die Wachstumsraten, die mit 25 mg DÄS (jeweils Implantat) und 20 mg Östradiol-17ß/200 mg Testosteron erzielt wurden, lagen in der gleichen Größenordnung; 20 mg Östradiol-17ß/200 mg Progesteron waren weniger effektiv und noch weniger wirkungsvoll waren 20 mg Östradiol-17ß allein. Zeranol (36 mg) und Trenbolon (140 mg) brachten,

wurden sie allein verabreicht, keinen signifikanten Erfolg. Die Verbindung Östradiol-17 β /Trenbolon (20 mg/140mg) war das Präparat, das die größte Gewichtszunahme hervorrief (10,5 - 15,8 kg Mehrzuwachs, im Vergleich zu Kontrolltieren).

An 64 Bullenkälbern untersuchten van der Wal und van Weerden (1973) die Effektivität der eingesetzten Hormone auch nach der Stickstoffretention. Sie stellten dabei die maximale Retention ebenso wie die größte Gewichtszunahme nach einer Behandlung in der 11. oder 12. Lebenswoche nach 4 bis 5 Wochen fest. In ihren Untersuchungen kommen van der Wal und van Weerden (1973) zu dem Schluß, daß der größte Teil der zusätzlichen Gewichtszunahmen bezogen auf Trockensubstanzbasis, infolge der Anabolikaverabreichung, auf eine zusätzliche Proteinbildung zurückzuführen ist, die aus einer verbesserten Umwandlung von pflanzlichem in tierisches Protein herrührt.

Bei unbehandelten Kälbern nahm der Prozentsatz des verdaulichen Futterproteins, das in Körperprotein umgewandelt wurde, allmählich von 70 % auf weniger als 40 % während der Wachstumsperiode ab. Durch die Zufuhr von Anabolika, z.B. 20 mg Östradiol-17 β plus 140 mg Trenbolonacetat, konnte dagegen dieses Absinken der Umwandlungsrate erheblich verlangsamt werden. Nach einer experimentellen Periode von 38 Tagen lag der

Prozentsatz des verdauten Proteins, das in Körperprotein umgewandelt wurde, in der Behandlungsgruppe noch bei 58 %, in der Kontrollgruppe war er dagegen bereits auf 39 % abgesunken. Ähnliche Effekte wurden nach Zufuhr von DÄS und der Wirkstoffkombination Östradiol-Testosteron bzw. Progesteron beobachtet. Weniger effektiv in dieser Hinsicht war die alleinige Gabe von Östradiol, Progesteron und Trenbolonacetat.

2.5. Derzeitige gesetzliche Situation in der Bundesrepublik Deutschland

Die gesetzliche Situation ist in der Bundesrepublik Deutschland eindeutig durch den § 4b Absatz 2 des Lebensmittelgesetzes geregelt, nach dem es verboten ist, "lebenden Tieren Stoffe mit östrogener oder thyreostatischer Wirkung einzupflanzen, einzuspritzen oder unvermischt oder nach Vermischung mit Futtermitteln oder anderen Stoffen zu verabfolgen, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beeinflussen".

Dem Verbot der Anwendung liegt wohl der Gedanke zu Grunde, daß der Verbraucher vor möglichen Rückständen in dem zum Verzehr geeigneten Tierkörperbestandteilen geschützt werden soll.

Die Praxis hat jedoch gezeigt, daß allein durch das Verbot der Östrogenmast das Problem nicht gelöst werden kann. Wie Schätzungen von Fachleuten besagen, liegt die illegale Anwendung Östrogenwirksamer Substanzen als Masthilfsmittel bei Mastkälbern in der Bundesrepublik Deutschland bei 40 - 50 % aller geschlachteten Kälber jährlich.

Seit dem 5.1.1974 (Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 1 Seite 18) ist dem Fleischbeschauer ein Gesetz in die Hand gegeben worden, das ihn ermächtigt, Rückstandsuntersuchungen bei Tieren vornehmen zu lassen, bei denen Anzeichen vorhanden sind, "die darauf hinweisen, daß den Tieren Stoffe mit pharmakologischer Wirkung zugeführt worden sind oder daß die Tiere andere Stoffe, die in Lebensmittel übergehen und gesundheitlich bedenklich sein können, aufgenommen haben" (§ 4 (4) ABA zum Fleischbeschaugesetz).

Sind die Rückstandsuntersuchungen, die für Östrogene mit dem Mäuseuterustest durchgeführt werden müssen, positiv, so ist das Tier nach § 32 Absatz (1) 23 der ABA des Fleischbeschaugesetzes untauglich zum Genuß für Menschen zu beurteilen.

2.6. Bisherige Untersuchungen zur Erfassung exogener
und endogener Östrogene und Gestagene beim Kalb

Im Gegensatz zur Situation beim erwachsenen Rind liegen für diese Entwicklungsphase des neugeborenen und des heranwachsenden Rindes nur sehr wenig hormonanalytische Befunde vor. Die bis zum Jahre 1972 durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung exogener und endogener Östrogene beim Kalb wurden von Behr (1973) im Rahmen seiner Dissertation ausführlich zusammengefaßt. Diese sind zum besseren Verständnis der Problematik vorliegender Arbeit in einem tabellarischen Überblick nochmals wiedergegeben.

Tab. 1 Endogene Östrogene beim Kalb

Östrogen	Vorkommen	Menge (Schwankungs- bereich)	Alter	Geschlecht	Meßverfahren	Literatur
Östron	Urin	0,23 mg/24 Std.	1.-5. Lebensstag	männlich	Photometrie nach Brown (1955)	Velle 1958
Östradiol- -17 β	Urin	0,24 mg/24 Std. 3,3 mg/24 Std.	1.-5. Lebensstag	weiblich männlich	Photometrie	Velle 1958
Gesamt- östrogene	Urin	2,3 mg/24 Std. 0,20 ng/ml- 11,40 ng/ml	4.-12. Lebenswoche	weiblich weiblich	Photometrie Fluorimetrie	Velle 1958 Karg et al. 1972, Behr 1973
Gesamt- östrogene	Urin	1,43-16,79 ng/ml	4.-12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno- test	Behr, Karg et al. 1972
Gesamt- östrogene	Follikel- flüssigk.	19,7 ng/ml	12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno- test	Karg et al. 1972; Behr 1973
Östron	Muskelge- webe	0,41 ng/g	12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno- test	Behr 1973; Hoffmann, Karg 1973
Östradiol- -17 β	Muskelge- webe	0,61 ng/g	12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno- test	Behr 1973; Hoffmann, Karg 1973
Gesamt- östrogene	Blut- plasma	0,099-0,133 ng/ml	29.-76. Lebensstag	weiblich	Radioimmuno- test	Hoffmann 1972
Gesamt- östrogene	Blut- plasma	0,016-0,333 ng/ml	45.-315. Lebensstag	weiblich	Radioimmuno- test	Hoffmann 1972

Über die Herkunft dieser endogenen Östrogene läßt sich keine gültige Aussage machen, teilweise wird eine gewisse Eigenproduktion für möglich gehalten (durch die Nebennierenrinde) und teilweise wird angenommen, daß maternale Östrogene im Fötus gespeichert und nach der Geburt ausgeschieden werden (Velle 1958).

Bei den in der nächsten Tabelle angegebenen Untersuchungen zur Erfassung exogener Östrogene beim Kalb sind die Stilbene nicht berücksichtigt, da in vorliegender Arbeit lediglich Untersuchungen mit den Verbindungen, die den körpereigenen Östrogenen und Gestagenen entsprechen, zur Diskussion stehen.

Tab. 2 Östrogene beim Kalb nach exogener Hormonzufuhr

Behandlung	Unter- sucht auf	Vorkommen	Menge	weitere Angaben	Geschlecht	Meßverfahren	Literatur
20 mg Östradiol- Benzoat + 200 mg Pro- gesteron I.M. Implan- tation	E ₂	Urin	1 ug/ 24 Std. 187 ug/ 24 Std.	5 Std. nach Implantation 15 Tage nach Implantation	männlich	Fluorimetrie nach Itt- rich 1960	Vogt et al. 1972
20 mg Östradiol- Benzoat + 200 mg Pro- gesteron S.C. Implan- tation	E ₂	Urin	3 ug/ 24 Std. 54 ug/ 24 Std.	6 Std. nach Implantation 9 Tage nach Implantation	männlich	Fluorimetrie nach Itt- rich 1960	Vogt et al. 1972
20 mg Östradiol- Benzoat + 200 mg Pro- gesteron S.C. Implan- tation	E ₂	Muskelge- webe	30 ug/kg 0,7 ug/ kg unterhalb d. Nachweis- grenze	0-5 cm von der Implantations- stelle 5-15 cm von der Implantations- stelle ab 15 cm Entfer- nung von der Implantations- stelle	männlich	Photometrie	Vogt et al. 1972

Fortsetzung der Tab. 2 Östrogene beim Kalb nach exogener Hormonzufuhr

Behandlung	Untersucht auf	Vorkommen	Menge	weitere Angaben	Geschlecht	Meßverfahren	Literatur
25 mg Östradiol-Benzozat + 140 mg Trenbolonacetat	GE	Urin	0,86-82,70 ng/ml 4,68-59,04 ng/ml	4. - 12. Lebenswoche	weiblich	Fluorimetrie Radioimmuno-test	Karg et al. 1972 Behr 1973
25 mg Östradiol-Benzozat + 140 mg Trenbolonacetat	GE	Follikel-flüssigk.	6,2 ng/ml	12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno-test	Karg et al. 1972 Behr 1973
25 mg Östradiol-Benzozat + 140 mg Trenbolonacetat	GE	Blut-plasma	0,205 ng/ml	4. - 12. Lebenswoche	weiblich	Radioimmuno-test	Behr 1973
25 mg Östradiol-Benzozat + 140 mg Trenbolonacetat	E ₁	Muskelgewebe	0,19 ng/g	36. Tag nach der Behandlung	weiblich	Radioimmuno-test	Behr 1973
25 mg Östradiol-Benzozat + 140 mg Trenbolonacetat	E ₂	Muskelgewebe	5,50 ng/g	36. Tag nach der Behandlung	weiblich	Radioimmuno-test	Behr 1973

E₁ = Östron
 E₂ = Östradiol-17β
 GE = Gesamtöstrogene

Angaben über Progesteron beim Kalb liegen von Donaldson et al. (1970) vor, die Progesteronmessungen um den Zeitpunkt der Pubertät durchführten. Sie konnten dabei über relativ kurze Zeiträume erhöhte Progesteronkonzentrationen im Plasma messen. Hoffmann (1972) konnte mit Hilfe des Radioimmunotests im peripheren Blut eines weiblichen Kalbes Progesteron in einer Konzentration von 0,35 ng/ml am 32. Lebenstag und von 0,15 ng/ml am 74. Lebenstag messen. Die Werte liegen dabei knapp unter den bei Bullen gemessenen (Hoffmann et al. 1973).

3. Methodischer Teil

3.1. Verfahren zur Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron

3.1.1. Überblick über die Möglichkeiten zur Bestimmung von Östrogenen und von Progesteron in niedrigen Konzentrationsbereichen

Grundsätzlich gibt es zur Bestimmung von Östrogenen und von Progesteron 3 Gruppen von Verfahren: Biologische, chemisch-physikalische und biochemische Methoden.

Wie bei Hoffmann (1972) klar dargestellt wurde, konnte für die Erfassung von Östrogenen und von Progesteron aus Gewebe auf Grund der notwendigen Empfindlichkeit von vornherein nur ein biochemisches Verfahren in Betracht kommen.

Biochemische Methoden für die Östrogenbestimmung wurden erstmals von Talalay und Marcus (1956) sowie Hurlock und Talalay (1957, 1958) beschrieben. Diese enzymatischen Meßverfahren, die auf der Messung von NADH^+ , nach Zugabe von Steroiddehydrogenase zum Substrat beruhen, haben sich nicht durchgesetzt,

da sowohl die Empfindlichkeit als auch die Spezifität nicht den gestellten Ansprüchen gerecht werden konnten (Hoffmann 1972).

Ein weiteres biochemisches Meßverfahren beruht auf dem Effekt der "Steroid-Proteinbindung". Die grundlegenden Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von Murphy (1964, 1967) durchgeführt.

Zur Bestimmung von Östrogenen mit Hilfe der Proteinbindungsmethode wurden bisher drei unterschiedliche "Bindungsproteine" eingesetzt:

- 1) das SBP (sex-steroid-binding plasma protein)
- 2) uterines Zytoplasma, das sogenannte "uterine cytosol", ein Rezeptormakromolekül, welches aus dem Uterus verschiedener Spezies gewonnen werden kann, sowie
- 3) gegen Östrogen gerichteter Antikörper.

Eine vergleichende Gegenüberstellung bei Verwendung der einzelnen Bindungsproteine gibt Hoffmann (1972).

Biochemische Methoden zur Progesteronbestimmung wurden bisher nur auf der Basis der Protein-Bindungs-Reaktion beschrieben.

Hierzu zählen die Verfahren der kompetitiven Protein-bindungsreaktion, bei denen als Bindungsprotein ein Plasmaprotein verwendet wird und die von Murphy (1964) inauguriert wurden, sowie die radioimmunologischen Methoden, bei denen als Bindungsprotein Antikörper verwendet werden (s. bei Hoffmann 1972).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde sowohl für die Östrogenbestimmung als auch für die Progesteronbestimmung ein radioimmunologisches Verfahren gewählt.

3.1.2. Radioimmunologisches Bestimmungsverfahren zur Messung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron

3.1.2.1. Prinzip der radioimmunologischen Steroidbestimmung

Voraussetzung für die Durchführung eines Radioimmuno-tests (RIT) ist zunächst die Gewinnung geeigneter Antikörper. Steroidhormone haben aber ein Molekulargewicht von ca. 300 (Engel 1963) und besitzen so, wie auch andere niedermolekulare Verbindungen, ursprünglich nicht die Eigenschaft, Antikörper zu bilden. Landsteiner (1933, 1945) konnte aber nachweisen, daß gewisse niedermolekulare Proteine antigen

wirksam sind, wobei die niedermolekulare Verbindung als Hapten wirkt. Dieses Hapten bewirkt als determinierende Gruppe des Antigens die Spezifität der Antikörper (Beiser et al. 1959; Erlanger et al. 1957, 1959; Goodfriend und Sehon 1958, 1961a, 1961b, 1970; Liebermann et al. 1959; Gross 1970). Die chemische Darstellung von Steroid-Protein-Konjugation gelang erstmals King und Franks (1941).

Die Eigenschaften der nach einer Immunisierung gewonnenen Antikörper sind für den Radioimmuntest von ausschlaggebender Bedeutung. Während die Spezifität der Antikörper im wesentlichen direkt von der Position und Art der Koppelung "Steroid-Protein" im Antigen abhängt (Niswender und Midgley 1970; Kuss und Goebel 1972a, 1972b), scheint die Assoziationskonstante, durch die ja die Empfindlichkeit des Radioimmuntests bestimmt wird, hauptsächlich von der Zahl der an das Protein gekoppelten Steroidmoleküle im Antigen (Jungblut 1971) sowie den immunoreaktiven Eigenschaften des immunisierten Tieres abzuhängen.

Die eigentliche Durchführung der Messung von Steroidhormonen mit Hilfe des Radioimmuntests kann grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip geschehen, wie es erstmals von Murphy et al. (1963) für die kompetitive Proteinbindungsreaktion beschrieben wurde.

Das dieser Reaktion zugrunde liegende Schema wurde von Murphy (1967) wie folgt definiert:

"In einem "in vitro" System befinden sich Proteine, freies Steroid und an Protein gebundenes Steroid in einem "dynamischen Equilibrium". Wird nun diesem "in vitro" System ein Steroidhormon zugesetzt, das ebenfalls von Protein gebunden werden kann, so muß sich ein neues Equilibrium einstellen. Hierbei wird ein Teil des ursprünglich an Protein gebundenen Steroids aus seiner Bindung verdrängt. Diese Verdrängung ist über einen bestimmten Größenbereich zu der dem "in vitro" System zugesetzten Steroidmenge proportional. Wenn nun dieser Verdrängungsvorgang erfaßt werden kann, so können Rückschlüsse auf die Menge des zugesetzten Steroids gezogen werden".

Werden nun statt "Plasmaproteine" Antikörper als Bindungsproteine eingesetzt, so spricht man vom "Radioimmunotest".

Im Vergleich mit den spezifisch Steroidhormon bindenden Plasmaproteinen wiesen die Immunglobuline eine höhere Assoziationskonstante auf ($\approx 10^8 \text{ L/mol}$ für Plasmaproteine, Westphal 1971; $\approx 10^9 \text{ L/mol}$ für Antikörper, Ferin et al. 1968).

Beim Einsatz von Antikörpern ist demnach zu beachten, daß auf Grund der höheren Assoziationskonstante der

Verdrängungsvorgang durch ein nachfolgend zugegebenes Steroid erschwert wird. Die Durchführung der Protein-bindungsreaktion erfolgte daher nach einem modifizierten Prinzip.

Nach diesem abgeänderten Prinzip (s. bei Hoffmann 1972) werden die koordinativen Bindungseigenschaften des Proteins für beide Steroidhormone, d.h. radioaktiv markiertes und nicht markiertes Steroid, gleichzeitig ausgenutzt, so daß sich proportional zur Menge des unmarkierten Steroids im Inkubationsansatz ein bestimmtes Gleichgewicht von Anfang an einstellt. Dieses Reaktionsschema zeigt Abb. 9.

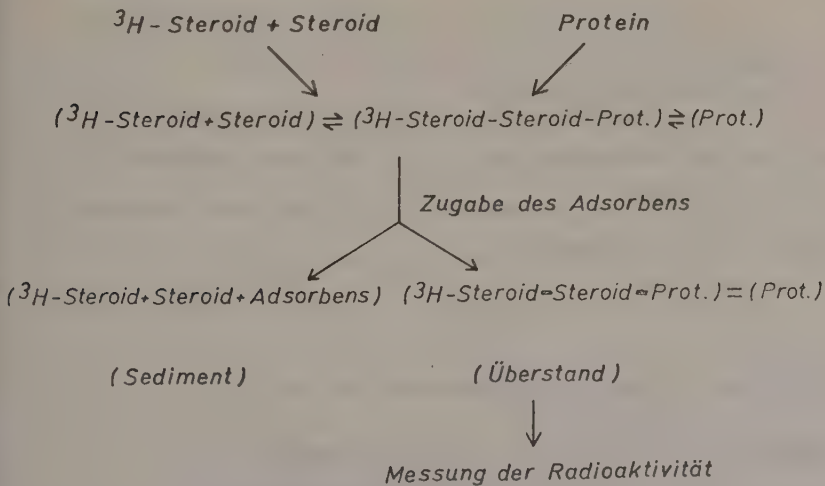


Abb. 9 Modifiziertes Schema der angewandten Protein-Bindungsreaktion

Wird nun eine gleichbleibende Menge markierten Steroids bereits vor der Antikörperzugabe mit verschiedenen Mengen des gleichen nicht markierten Hormons verdünnt (Isotopenverdünnung), so wird - abhängig von den Mengen des nicht markierten Steroids - mehr bzw. weniger am markierten Steroid an den Antikörper nach dessen Zugabe gebunden werden. Die Bindung von markiertem Steroid ist dabei über einen bestimmten Bereich umgekehrt proportional der Menge des zugegebenen, nicht markierten Hormons; nach Erstellung einer Eichkurve können so unbekannte Mengen erfasst werden.

3.1.2.2. Verwendete Antisera

Die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden Antisera wurden nach Immunisierung von Kaninchen gewonnen und bei -18°C aufbewahrt.

3.1.2.2.1. Antiserum zur Bestimmung von Östron

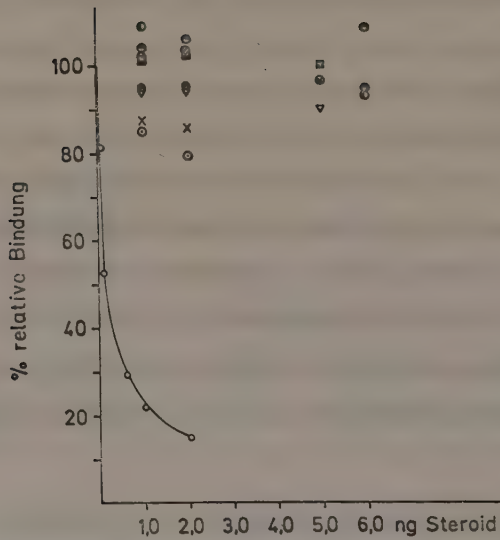
Dieses Antiserum ist ein großzügiges Geschenk von P. D. Dr. E. Kuss, 1. Universitätsfrauenklinik, München. Es trägt die Bezeichnung "AS 436".

Zur Gewinnung von Antikörpern wurde als Antigen Östron-6 (O-carboxymethyl)-oxim-RSA (E_1 -6 CMO-RSA) verwendet.

Bei diesem Antigen fand die Kopplung zwischen Steroid und Protein am Kohlenstoffatom C-6 statt (Kuss und Goebel 1972b), wobei die beiden funktionellen Gruppen im A- und D-Ring unbeeinflusst blieben. Aus diesem Grund lassen die mit diesem Antigen gewonnenen Antikörper von Anfang an eine relativ höhere Spezifität erwarten.

Die von Kuss angegebene, hohe Spezifität des Antiserums gegenüber Östron konnte bestätigt werden, wie aus Abb. 10 hervorgeht.

Für Versuchszwecke wurde das Antiserum mit RSA-Puffer auf 0,007 % verdünnt; 23 pg ^3H -Östron wurden bei dieser Verdünnung im Radioimmunotest zu 50 % gebunden.



getestete Steroide:

- | | |
|-----------------------------|---------------------|
| 1) x Östradiol-17 β | 6) • Cortisol |
| 2) • Östron | 7) • DEA |
| 3) • Östradiol-17 α | 8) v Androstendion |
| 4) ■ Pregnenolon | 9) • Testosteron |
| 5) • Progesteron | |

Abb. 10 Kreuzreaktionen verschiedener Steroide
mit Antikörpern gegen "E₁-6 CMO-RSA" (AS 436)

3.1.2.2.2. Antiserum zur Bestimmung von Östradiol-17 β

Das Antiserum zur Bestimmung von Östradiol-17 β , das die Bezeichnung Pool I AK 16 trug, wurde im eigenen Labor synthetisiert (Arbeitsgruppe Hoffmann/Kyrein). Als Antigen wurde 17 β -Östradiol-6 (O-carboxymethyl)-oxim-Rinderserumalbumin (17 β -Oe2-6CMO-RSA) verwendet.

Die zur Herstellung dieses Antiserum-Pools verwendeten Einzelsera zeigten in keinem Fall Kreuzreaktionen mit nicht phenolischen Steroiden. Es erschien deshalb ausreichend, die Kreuzreaktivität vom Antiserum Pool I AK 16 stellvertretend für die nicht phenolischen Steroide gegenüber Testosteron, Dehydroepiandrosteron und Progesteron zu überprüfen. Auch die Kreuzreaktionen gegenüber Östron und Östradiol-17 α wurde überprüft. Wie Abb. 11 zeigt, wurde lediglich mit Östron eine geringgradige Kreuzreaktion beobachtet. Für Versuchszwecke wurde dieses Antiserum mit RSA-Puffer auf 0,02 % verdünnt. Bei dieser Verdünnung wurden 28 pg ^3H -Östradiol-17 β noch zu ca. 50 % gebunden.

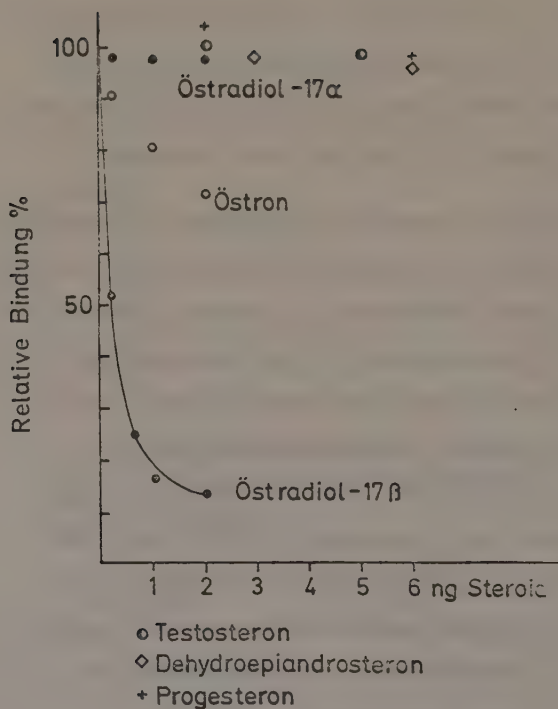
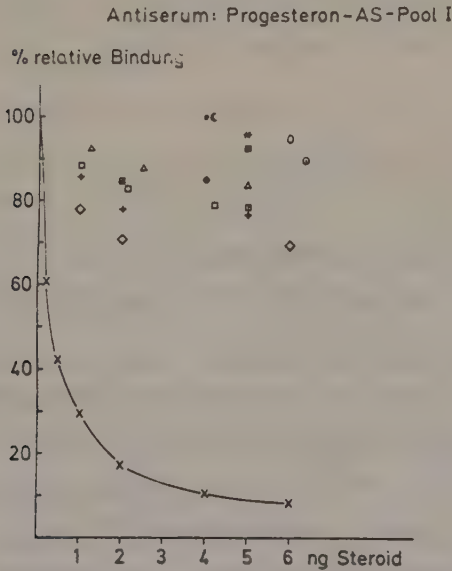


Abb. 11 Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit
Antikörpern gegen Pool I AK 16

3.1.2.2.3. Antiserum zur Bestimmung von Progesteron

Auch dieses Antiserum, das die Bezeichnung Prog-Pool I trug, wurde im eigenen Labor hergestellt (Hoffmann et al. 1973).

Als Antigen zur Erzeugung spezifischer Antikörper wurde 11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin (11 α -OH-Progesteron-HS'RSA) verwendet.



getestete Steroide:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| x Progesteron | ■ Corticosteron |
| • 17 α -OH-Progesteron | ◇ DOC |
| ◻ 20 α -OH-Progesteron | ◄ Cortisol |
| ◉ 20 β -OH-Progesteron | ■ Testosteron |
| △ Pregnandiol | ○ DEA |
| * Pregnantriol | • 17 β -Östradiol |
| ◆ Pregnenolon | |

Abb. 12 Prog-Pool I

Auch dieses Antiserum, bei dem es sich ebenfalls um einen Pool handelte, wurde in einer Verdünnung von 0,02 % angewendet.

Die Überprüfung auf Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden ergab, daß auch hier die höchste Affinität zu Progesteron vorliegt. Lediglich mit Desoxycorticosteron (DOC) wurde eine geringgradige Kreuzreaktion beobachtet, die jedoch nicht weiter ins Gewicht fällt.

3.1.2.3. Durchführung des Radioimmunotests

Die Durchführung des Radioimmunotests geschah, abgesehen von kleinen Modifikationen, nach dem bei Hoffmann (1972) angegebenen Modus.

Die für den Radioimmunotest vorbereiteten biologischen Proben wurden im Stickstoffstrom bei 40° C oder im Vacuumschrank (siehe Kapitel 3.5.), ebenfalls bei 40° C, niedergetrocknet. Hierauf wurden mit dem Pipettor 0,1 ml Phosphatpuffer (pH = 7,2) zugegeben (siehe Kapitel 3.5.).

Parallel wurden dazu zur Erstellung einer Standardkurve in Einwegreagenzgläser in aufsteigender Reihenfolge 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 und 2,0 ng Östron bzw. Östradiol-17 β oder Progesteron - gelöst in 0,1 ml

Phosphatpuffer - im Doppelansatz einpipettiert.

Daraufhin wurden zu allen Proben, je nach Test ca. 20.000 dpm mit Tritium (^3H) markiertes Östrogen oder ca. 40.000 dpm ^3H -Progesteron in 0,1 ml Phosphatpuffer gelöst - von nun an als "Vorlage" bezeichnet - zugegeben.

Erst dann erfolgte die Zugabe von 0,5 ml der auf die entsprechende Konzentration eingestellten Antiserumverdünnung.

Die so angesetzten Proben wurden dann 15 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. In der Mitte dieser Inkubationsperiode wurden die Proben kurz an einem "Vortexmischer" aufgeschüttelt, um eine vollständige Lösung und Verteilung zu garantieren.

Nach einer weiteren Inkubation für eine Stunde im Eisbad (ca. 4°C) erfolgte die Zugabe von 0,5 ml einer auf 4°C gekühlten 0,5 %-igen Holzkohlensuspension (siehe Kapitel 3.5.) zur Trennung der freien von den an Protein gebundenen Steroide. Die Proben wurden daraufhin eine Minute "en bloc" im Gestell gut geschüttelt, nochmals für weitere fünf Minuten ins Eisbad gestellt und anschließend 15 Minuten in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 2000 UpM abzentrifugiert.

Die Kohle bildete einen gut abgesetzten Bodensatz. Der Überstand, in dem sich die am Protein gebundenen Steroide befinden, wurde mit einer 1 ml Eppendorfpipette oder durch Abkippen, zur Bestimmung der Radioaktivität, in eine Zählküvette, die bereits 10 ml Bray's-solution enthielt, verbracht (siehe Kapitel 3.5.).

Die Radioaktivität wurde an einem Flüssigkeits-scintillationszähler gemessen. Es wurde darauf geachtet, daß eine Probenserie stets den gleichen Zählbedingungen unterworfen wurde.

Die quantitative Auswertung der Proteinbindungsreaktion wurde anhand von Standardkurven durchgeführt, die sich, wie vorne schon erwähnt, von 0,0 bis 2,0 ng Östrogen bzw. Progesteron erstreckte. In der Handhabung der Proben wurde eine bestimmte Reihenfolge eingehalten, wobei die ersten acht und letzten acht Proben einer Testreihe jeweils eine Standardkurve darstellten.

Die Übereinstimmung dieser beiden Standardkurven war unter anderem ein Kriterium für die Beurteilung des Tests. Zur Kontrolle der Bindung wurden in jeder Probenserie auch zwei Nullwerte mit angesetzt, denen anstelle von Kohle 0,5 ml Puffer zugesetzt wurde.

Am Beispiel von Östradiol-17 β ist eine solche Standardkurve dargestellt.

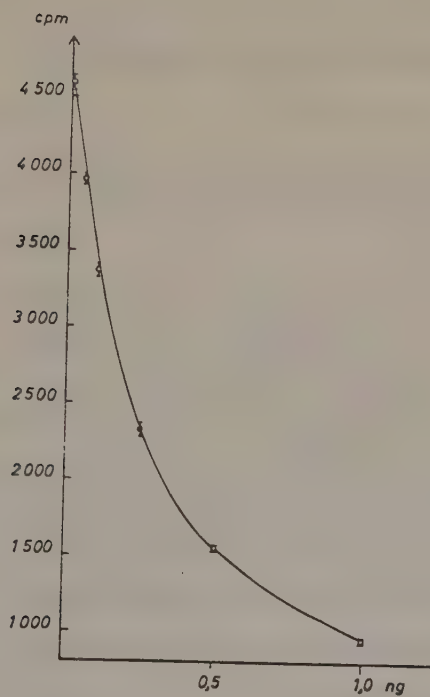


Abb. 13 Östradiol-17 β Standardkurve bei Anwendung
des Radioimmunotests

3.1.2.4. Vorbereitung der Proben für die radioimmunologische Östrogenbestimmung

3.1.2.4.1. Extraktion von Muskel-, Leber- und Nierengewebe

Um Konzentrationen von Steroidhormonen im Gewebe messen zu können, müssen die Gewebeproben zuerst soweit zerkleinert werden, daß ihre Zellstruktur möglichst vollständig zerstört wird. Um dies zu erreichen, mußte das Gewebe homogenisiert werden.

Die Gewebeproben, die bei -18° C aufbewahrt wurden, wurden aufgetaut, bis sie mit einer kleinen Schere schneidbar waren. Dann wurden aus der Tiefe des Gewebsstückes 1,0 g herausgeschnitten und in den ersten Versuchen in ein 30 ml Zentrifugenglas mit Schliff eingewogen (siehe b. Behr 1973). Später wurde das Gewebe in Glasscintillationsgefäße eingewogen, was zu großen Vorteilen im Aufarbeitungsgang führte. Bei der Einwaage von Muskelgewebe wurde besonders darauf geachtet, daß möglichst wenig Bindegewebe erfaßt wurde. Zur Berechnung des Aufarbeitungsverlustes erfolgte die Zugabe des internen Standards direkt auf das Gewebe (siehe Kapitel 3.1.2.6. Berechnung der Wiederfindung).

Nach Zugabe von 5,0 ml Aqua dest. wurden mit einem Ultra-Turrax-Gerät (siehe Kapitel 3.5.) die durch Eis gekühlten Proben direkt im Scintillationsglas homogenisiert, Leber- und Nierengewebe ca. 30 Sekunden lang, Muskelgewebe zwei Minuten lang. (Der Schaft des Ultra-Turrax-Gerätes wurde nachher an der Glaswand abgestreift).

Bis zu 40 Proben wurden so homogenisiert, anschließend wurden zu jeder Probe 5 ml Äther pro narcosi (siehe Kapitel 3.5.) mit Hilfe eines Kippautomaten zugegeben. Nach Verschluss der Proben (Einweg-Schraubverschluss mit Kork-Zinnfolieneinlage, siehe Kapitel 3.5.) wurden diese in einem 40 Proben fassenden Ständer (hergestellt von der Anstaltswerkstätte) auf einem eindimensionalen Schüttler der Firma Bühler 20 Minuten lang bei einer Schüttelfrequenz von 120 Bewegungen pro Minute geschüttelt.

Um danach eine bessere Phasentrennung zu erreichen, und um speziell die beim Lebergewebe auftretenden Emulsionen zu beseitigen, wurden die Proben in einer Hettich Rotixa Zentrifuge sieben Minuten lang bei 2000 UpM abzentrifugiert. Die Proben wurden daraufhin im Ständer, der einen Metallboden hatte, bei -30°C mindestens zwei Stunden eingefroren. Der überstehende Ätherextrakt, in dem die Steroide gelöst waren, wurde

von dem festgefrorenen Homogenat in konische 15 ml fassende Zentrifugengläser abgeschüttet. Daraufhin wurden die Proben bei 37° C aufgetaut und die Ätherextraktion zweimal wiederholt.

Der neue modifizierte Extraktionsgang mit Einwaage des Gewebes in Glasscintillationsgläser mit Schraubverschluß brachte mehrere Vorteile gegenüber dem bei Behr (1973) beschriebenen Extraktionsgang mit Einwaage in 30 ml Zentrifugengläser mit Schliff mit sich. So wurde es möglich, bis zu 40 Proben in einer Serie zu extrahieren, da das Schütteln, wie oben beschrieben, von einem Schüttelautomaten durchgeführt wurde, wogegen es bei dem 30 ml fassenden Zentrifugenglas noch notwendig war, jede Probe zwei Minuten lang mit der Hand zu schütteln. Weiterhin war der neu eingebrachte Einfrierungsschritt mit dem sich anschließenden Abkippen des Ätherextraktes eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem früher üblichen Abhebern des Ätherextraktes, da hier sowohl durch das Einfrieren beim Schütteln erzeugte Emulsionen gebrochen wurden als auch der Äther quantitativ und ohne Gewebeanteile transferiert werden konnte.

Als weiterer Vorteil dieser "maschinellen Methode" ist zu werten, daß dabei nach drei Extraktionen tatsächlich 15 ml Ätherextrakt gesammelt wurden,

während bei der "alten Methode" während des Schüttelns durch die Wärme, die von der Hand ausging, ein Großteil des Äthers verdampfte.

Nach dieser ersten Extraktion wurde der Ätherextrakt im Stickstoffstrom oder im Vacuumofen (siehe Kapitel 3.5.) bei 40° C niedergetrocknet. Nun folgte eine Lösungs-mittelverteilung, wozu zu den niedergetrockneten Proben 5 ml Petroläther und 1 ml 80 %-iges Methanol zugegeben wurde. Die Proben wurden dann 30 Sekunden an einem Vortexmixer gemischt und anschließend zur optimalen Trennung der beiden Phasen kurz an einer Tischzentrifuge bei 4000 UpM abzentrifugiert. Die Methanolphase wurde mit einer Pasteur-Pipette durch die Petrolätherphase hindurch in ein weiteres konisches Zentrifugenglas abgehebert.

Auch dieser Arbeitsgang wurde zweimal wiederholt. Die vereinigten Methanolextrakte wurden über Nacht im Vacuumschrank niedergetrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform im Verhältnis 5 : 1 aufgenommen und dreimal mit 1 N-Natronlauge extrahiert. Auch hier wurde die Probe wieder am Vortexmixer 30 Sekunden geschüttelt und dann abzentrifugiert. Die in einem weiteren konischen Glas gesammelten NaOH-Extrakte enthielten die phenolische Fraktion, also die Östrogene.

Die Trennung beruhte auf der Tatsache, daß die Östrogene auf Grund ihres phenolischen A-Ringes im stark alkalischen Milieu wasserlösliche Salze bildeten und in dieser Form von anderen mitextrahierten Steroiden, z.B. Progesteron, durch Verteilung zwischen einem organischen Lösungsmittel und einer wässrigen alkalischen Phase abgetrennt werden konnten.

Somit war es also auch möglich, Progesteron und Östrogene aus einem Homogenat zu bestimmen, da Progesteron in der organischen Phase verblieb, die Östrogene aber in der wässrigen Phase blieben.

Durch Zugabe von ca. 1,6 ml 1 N Salzsäure zu den vereinigten Natronlaugen-Extrakten wurden die Proben in den sauren Bereich verbracht, worauf die Östrogene in ihrer ursprünglichen freien Form wieder vorlagen. Sie konnten nun wieder durch eine dreimalige Extraktion mit 2,0 ml Chloroform aus der Wasserphase extrahiert werden. Der so gewonnene Chloroformextrakt wurde im Stickstoffstrom auf 3,0 ml eingeeengt und anschließend einmal mit 1,0 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) und zweimal mit 1,0 ml Aqua dest. gewaschen. Die Probe wurde nun vollends niedergetrocknet, wobei die Glaswand mit einigen Tropfen Methanol nachgespült wurde, um den Extrakt am Boden des Glases zu konzentrieren.

Die niedergetrockneten Extrakte wurden in 0,1 ml Benzol-Methanol (85 : 15) gelöst und einer säulen-chromatographischen Trennung unterworfen (Mikhail et al. 1969). Die Säule, die mit Sephadex LH 20 gefüllt war, war 9 cm lang und 8 mm im Durchmesser. Als Laufmittel wurde, wie bereits erwähnt, Benzol-Methanol im Verhältnis 85 : 15 hergenommen. Nach dem Eindringen des Auftragsvolumens wurden 2 ml Laufmittel aufgetragen, die Passage durch die Säule abgewartet und als Fraktion F_1 in Einmalgläsern gesammelt. Entsprechend wurden 3,0; 1,0 und 4,0 ml Laufmittel nacheinander aufgetragen und als Fraktionen F_2 , F_3 und F_4 gesammelt. Fraktion F_2 enthielt dabei das Östron und Fraktion F_4 das Östradiol-17 β . In Abb. 14 ist eine solche Trennung graphisch dargestellt.

Alle Fraktionen wurden niedergetrocknet und in 1 ml Methanol aufgenommen. Davon wurden jeweils als Aliquot 0,1 ml zur Erfassung der Radioaktivität, d.h. zur Berechnung der Aufarbeitungsverluste entnommen und in ein Plastikscintillationsglas, das mit 10 ml Bray's-solution gefüllt war, transferiert (siehe Kapitel 3.1.2.6. Berechnung der Wiederfindung).

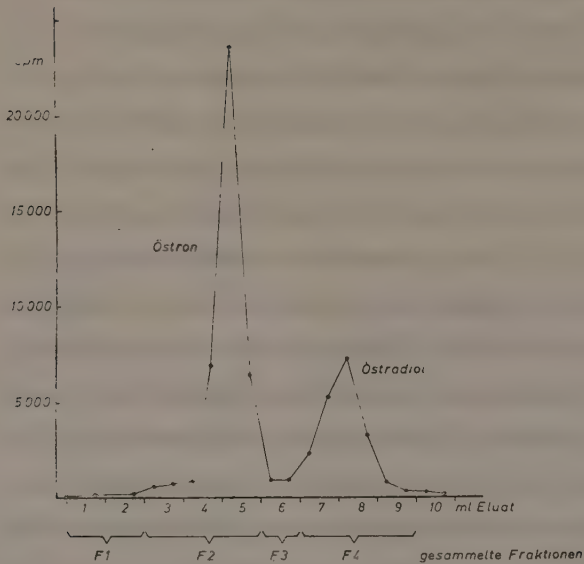


Abb. 14 Trennung von Östron und Östradiol-17 β auf Sephadex LH 20 Säulen

Die Impulse in den einzelnen Fraktionen dienten auch zur Beurteilung des Trenneffektes der Säule bei jeder einzelnen Probe. Da der Trenneffekt der Säulen konstant gut war, wurde im Verlauf der Versuche darauf verzichtet, die Fraktionen F₁ und F₃ auf Radioaktivität zu untersuchen.

Jede Chromatographiesäule wurde nach Verwendung mit 150 ml des oben angegebenen Laufmittels gespült und in einem mit Laufmittel gefüllten Tank aufbewahrt.

3.1.2.4.2. Extraktion von Fettgewebe

3.1.2.4.2.1. Vorversuche

1. Vorversuch.

Da eine Homogenisation des Fettgewebes mit dem Ultra-Turrax-Gerät nicht durchführbar war (zuviel Fett blieb daran haften), wurde zunächst versucht, Fett direkt in Petroläther aufzulösen. Hierzu wurde 1 g Fettgewebe in ein Becherglas eingewogen und nach Zugabe der internen Standards (siehe Kapitel 3.1.2.6.) wurde das Fett bei 37° C im Wasserbad nach kräftigem Rühren mit einem Glasstab in etwa 5 ml Petroläther zur Lösung gebracht (einige Bindegewebesteile blieben zurück). Daraufhin wurde die Probe in einen 500 ml Scheidetrichter transferiert und nach mehrmaligem Rückspülen mit Petroläther auf 200 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 150 ml 80 %-igem Methanol wurde der Scheidetrichter heftig geschüttelt. Nach ca. 10 - 15 Minuten wurde die methanolische Phase in einen zweiten Scheidetrichter

verbracht, der ebenfalls 200 ml Petroläther enthielt; dieser wurde wieder heftig geschüttelt und nach weiteren 15 Minuten wurde die Methanolphase in einen Rundkolben abgelassen.

Diese Methanolmenge wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Extrakt wurde danach zweimal mit einigen Millilitern Methanol und einmal mit einigen Millilitern Chloroform in ein konisches Zentrifugenglas verbracht und unter Stickstoff niedergetrocknet. Es konnte nun die Trennung zwischen neutraler und phenolischer Fraktion durchgeführt werden (siehe oben). Die phenolische Fraktion wurde der Säulenchromatographie unterworfen, wonach der Radioimmunotest durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.1.2.3.).

2. Vorversuch.

Obwohl nach Anwendung dieses Extraktionsganges positive Meßergebnisse erzielt worden waren (die Wiederfindung des radioaktiv zugesetzten Hormons lag bei 46,58 % für Östron und bei 38,45 % für Östradiol-17 β in jeweils 33 Untersuchungen), wurde versucht, auf Grund der hohen Arbeits- wie auch des Zeit- und Materialaufwandes, ein anderes Extraktionsverfahren zu erstellen.

In einem weiteren Versuch wurden daher 0,5 g Fett in ein konisches Zentrifugenglas eingewogen und in 3 ml Chloroform im Wasserbad bei 37° C nach kräftigem Rühren mit einem Glasstab in Lösung gebracht. Zu den bei 37° C gehaltenen Proben wurden 3 ml Methanol zugegeben. Nach 30 Sekunden Schütteln am Vortex-mixer wurden die Proben eine Stunde bei -30° C aufbewahrt, - in dieser Zeit fiel ein Großteil des Fetts wieder aus. Nach kurzer Zentrifugation im Kältelabor bildete das Fett eine obere Schicht, die mit einer Einweg-Pasteurpipette durchstoßen wurde, um das Chloroform-Methanolgemisch in ein weiteres konisches Zentrifugenglas zu transferieren. Das abgeheberte Chloroform-Methanol wurde im Stickstoffstrom eingeengt und der Extrakt in 3 ml Methanol und 2 ml Äther aufgenommen. Die nun erneut in Lösung gebrachte Probe wurde eine Stunde bei -30° C aufbewahrt, wo es zu einer weiteren Lipidfällung kam. Nach einem kurzen Abzentrifugieren (Fett bildete Bodensatz!) in der Kühlzentrifuge wurde das überstehende Lösungsmittelgemisch abgekippt. Nach erneutem Niedertrocknen wurde der Extrakt in 3 ml Methanol aufgenommen und die Polarität durch Zugabe von 0,5 ml Aqua dest. erhöht. Eine letzte Lipidausfällung fand durch nochmaliges Aufbewahren der Probe bei -30° C für mindestens eine

Stunde statt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der überstehende Anteil wieder abgekippt und niedergetrocknet.

Nach diesem Schritt erfolgte eine Trennung zwischen der phenolischen und der neutralen Fraktion. Bis zu dieser Stufe waren aber bereits 40 - 60 % Aufarbeitungsverluste zu verzeichnen. Nach Durchführung der Säulenchromatographie war die Wiederfindung in vielen Fällen unter 30 % abgesunken. Obwohl auch nach Anwendung dieses modifizierten Extraktionsganges brauchbare Meßwerte erzielt wurden und bis zu 40 Proben im Parallelansatz bearbeitet werden konnten, erschien diese Modifikation auf Grund der niedrigen Wiederfindung nicht geeignet zu sein, für weitere Versuche eingesetzt zu werden.

3. Vorversuch.

In diesem Vorversuch wurden 0,5 g Fett in ein Glas-scintillationsgefäß eingewogen und als Lösungsmittel 6 ml Chloroform zugegeben. Die gut verschlossenen Proben wurden dann zwei Stunden im Wasserbad bei 50° C geschüttelt, wonach das verbleibende Bindewebsgerüst noch mit einem Glasstab ausgedrückt wurde. Der Chloroformextrakt wurde über einen

Glaswollefilter in ein weiteres Scintillationsglas abgegossen. Der Extrakt wurde dann niedergetrocknet, in 4 ml Petroläther aufgenommen und eine Lösungsmittelverteilung gegen 4 ml 80 %-iges Methanol durchgeführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die in einem konischen 15 ml fassenden Zentrifugenglas vereinigten Methanolextrakte wurden niedergetrocknet, 1 ml Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff (5 : 1) wurden zugegeben und die phenolische Fraktion, bzw. Östron und Östradiol, wie oben beschrieben (siehe Kapitel 3.1.2.4.1.), gewonnen. Mit diesen Extraktionsverfahren wurden erstmals zufriedenstellende Wiederfindungen erreicht. Auch der Reagentienleerwert lag bei diesem Vorversuch sehr niedrig, zwischen 20 pg und 30 pg. Diese Extraktionsmethode schien daher für die Einrichtung eines definitiven Arbeitsganges geeignet zu sein.

3.1.2.4.2.2. Endgültiger Aufarbeitungsgang

0,5 g Fett wurden in Glasscintillationsgläser eingewogen und dann mit 6 ml Chloroform bei 50° C zwei Stunden lang in einem Wasserbad geschüttelt. Bei Verwendung der in Kapitel 3.5. beschriebenen Probenhalter konnten 40 Proben im Parallelansatz extrahiert werden.

Danach wurde das nicht aufgelöste Bindegewebsgerüst in jeder Probe mit einem Glasstab ausgedrückt und das Chloroform über einem Glaswollefilter in ein zweites Scintillationsglas abgekippt. Die Chloroform-extrakte wurden im Vacuumofen bei 40° C über Nacht niedergetrocknet. Die Extrakte wurden dann in 4 ml Petroläther aufgenommen und gegen 4 ml 80 %-iges Methanol 15 Minuten lang auf einem eindimensionalen Schüttler (siehe Kapitel 3.5.) ausgeschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die methanolische Phase in ein konisches Zentrifugenglas transferiert. Der zurückgebliebene Petroläther wurde dann noch zweimal mit 4 ml 80 %-igem Methanol extrahiert. Die methanolischen Phasen einer jeden Probe wurden vereinigt und niedergetrocknet. Die weitere Gewinnung der phenolischen Fraktion bzw. von Östron und Östradiol-17 β geschah, wie in Kapitel 3.1.2.4.1. beschrieben.

Mit diesem Extraktionsverfahren wurden Wiederfindungen erreicht, die bei Östron im Durchschnitt bei 52,15 % ($\pm$ 12,60) und bei Östradiol bei 55,75 % ($\pm$ 10,91) lagen. Der Reagentienleerwert lag zwischen 0 und 30 pg. Dieses Extraktionsverfahren erwies sich als gut durchführbar, ebenso sind der Material- wie Zeit- und Arbeitsaufwand nicht allzu hoch.

3.1.2.5. Vorbereitung der Proben für die radioimmunologische Progesteronbestimmung

3.1.2.5.1. Extraktionsgang für Muskel-, Leber- und Nierengewebe bei gleichzeitiger Östrogenbestimmung

Wie in Kapitel 3.1.2.4.1. beschrieben ist, wurde zur Isolierung der Östrogene in jedem Fall die phenolische Fraktion gewonnen, wozu eine Lösungsmittelverteilung zwischen einem organischen Lösungsmittel (Gemisch Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform = 5 : 1) und 1 n Natronlauge durchgeführt wurde. Das Progesteron verblieb dabei in dem organischen Lösungsmittel. Bis zu diesem Zeitpunkt verlief die Östrogenbestimmung und die Progesteronbestimmung in einem Arbeitsgang. Bei der weiteren Reinigung oder Aufarbeitung wurde wie folgt vorgegangen: Das Tetrachlorkohlenstoff/Chloroformgemisch wurde mit 1 ml Phosphatpuffer (pH = 7,2) und anschließend zweimal mit 1 ml Aqua dest. gewaschen. Das so vorgereinigte Tetrachlorkohlenstoff/Chloroformgemisch wurde unter Stickstoff bei 40° C oder im Vacuumofen niedergetrocknet. Der Extrakt wurde darauf in 3,0 ml 80 %-igem Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 3 ml Petroläther wurde die Probe

30 Sekunden am Vortexmixer geschüttelt und anschließend kurz abzentrifugiert; die überstehende Petrolätherphase wurde abgehebert und verworfen. Die methanolische Phase, die das Progesteron enthielt, wurde im Stickstoffstrom niedergetrocknet und der Extrakt einer säulenchromatographischen Reinigung unterzogen. Der Extrakt wurde dazu in 150 λ Laufmittel aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Es handelte sich um eine 31 cm lange und 1 cm im Durchmesser starke Säule aus Sephadex LH 20 (das Laufmittel setzte sich zusammen aus 100 Teilen Heptan, 100 Teilen Chloroform, 1 Teil Äthanol und war mit 1 Teil Wasser abgesättigt). Für den Ansatz des Laufmittels wurden die einzelnen Bestandteile in einem Scheidetrichter zusammengebracht, gut durchgemischt und eine Stunde stehengelassen. Das überstehende Wasser wurde verworfen.

Nach dem Eindringen des Extraktes in die Säule wurden 6 ml Laufmittel aufgetragen, die Passage durch die Säule abgewartet und als Fraktion F_1 aufgefangen. Dementsprechend bestand Fraktion F_2 aus 10 ml und enthielt das Progesteron. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Stickstoff niedergetrocknet und der Extrakt in 1,0 ml Methanol aufgenommen. Zur Berechnung der Wiederfindung wurden darauf 0,1 ml entnommen und

der Rest dem Radioimmunotest zugeführt. Nach den in Kapitel 3.1.2.5.2. geschilderten Erfahrungen scheint es auch bei dieser Art der Extraktion zumindest theoretisch möglich zu sein, zukünftig die Progesteronbestimmung direkt in der durch eine Lösungsmittelverteilung gereinigten neutralen Fraktion durchzuführen.

3.1.2.5.2. Extraktionsgang für Muskel-, Leber- und Nierengewebe bei alleiniger Bestimmung von Progesteron

Da es nicht immer möglich war, die Progesteronbestimmung unmittelbar nach der Östrogenbestimmung durchzuführen, mußte in vielen Fällen die neutrale Fraktion über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Hierbei zeigte sich, daß durch diese längere Aufbewahrung eine anschließende Progesteronbestimmung nicht mehr möglich war. Wahrscheinlich durch Adsorption des Progesterons an die Glasoberfläche wurden in den meisten Fällen keine positiven Meßwerte mehr erhalten. Es war daher notwendig, in zahlreichen Proben nach der Östrogenbestimmung Progesteron nochmals gesondert zu messen. Dabei stellte sich die Frage, ob es notwendig ist, den relativ aufwendigen Extraktionsgang für die Östrogenbestimmung durchzuführen oder ob es möglich

ist, Progesteron direkt nach Homogenisierung des Gewebes durch eine selektive Extraktion mit Petroläther zu erfassen und zu bestimmen, also ohne die Trennung zwischen neutraler und phenolischer Fraktion. Diese Versuchseinstellung erscheint auf Grund der Spezifität des verwendeten Antiserums möglich zu sein (siehe Kapitel 3.1.2.2.3.).

Vorversuch.

In ersten Versuchen wurden 1 g Gewebe, wie in Kapitel 3.1.2.4.1. geschildert, in einem Glascintillationsgefäß, nach Zugabe des internen Standards, in 5 ml Aqua dest. homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml Petroläther zu jeder Probe wurde 20 Minuten auf dem in Kapitel 3.5. beschriebenen eindimensionalen Schüttler geschüttelt, anschließend 7 Minuten lang in einer Hettich-Rotixa-Zentrifuge abzentrifugiert und die Probe mindestens zwei Stunden bei -30° C eingefroren. Der überstehende Petroläther wurde in konische Zentrifugengläser abgekippt und der ganze Extraktionsvorgang zweimal wiederholt.

Die pro Probe vereinigten Petroläthermengen wurden im Stickstoffstrom oder im Vacuumofen bei 40° C niedergetrocknet und der Extrakt in 2 ml Methanol

aufgenommen und eine Minute am Vortexmixer geschüttelt. Danach wurden die Proben über Nacht bei -30°C ausgefroren und am nächsten Morgen im Kältelabor bei $+4^{\circ}\text{C}$ 10 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Das Methanol wurde in Einmalgläser abgehebert bzw. abgekippt und mit 0,5 ml Aqua dest. versetzt. Dieser Reinigungsschritt wurde zunächst in Anlehnung an die von Hoffmann und Hamburger (1973) beschriebene Methode zur Progesteronextraktion aus Milch eingebracht.

Da sich aber bei der Progesteronextraktion aus Gewebe - im Gegensatz zur Extraktion aus Milch - kein Präzipitat bildete, wurde hier dieser Reinigungsschritt später weggelassen. Der niedergetrocknete Extrakt wurde dann direkt - also ohne vorausgehende Ausfrierung in Methanol - in 3 ml 80 %-igem Methanol aufgenommen und dreimal gegen 2 ml Petroläther ausgeschüttelt (30 Sekunden Vortexmixer und kurzes Abzentrifugieren). Der überstehende Petroläther wurde verworfen und der Methanolextrakt niedergetrocknet. Theoretisch wäre es möglich gewesen, ähnlich wie bei Bestimmung von Progesteron in der Milch, zu diesem Zeitpunkt bereits eine radioimmunologische Progesteronmessung durchzuführen. Es sollte jedoch zunächst die Spezifität der Methodik überprüft werden. Im Parallelansatz wurde der Extrakt daher einmal ohne und einmal nach einem zusätzlichen säulenchromatographischen

Reinigungsschritt dem Radioimmunotest zugeführt.
Die säulenchromatographische Reinigung entsprach der
im vorhergehenden Kapitel 3.1.2.5.1. beschriebenen.
Die Ergebnisse einer solchen Versuchsreihe zeigt
Tabelle 3:

Tab. 3 Progesteronbestimmung im Gewebe mit und ohne
säulenchromatographische Reinigung

Gewebe	Progesteron ng/g Gewebe	
	<u>mit</u>	<u>ohne</u>
	säulenchromatographischer Reinigung	
Muskel	0,140	0,190
	0,150	0,230
	0,230	0,280
	0,300	0,430
	0,040	0,130
	0,160	0,190
Leber	0,200	0,350
	0,300	0,380
	0,110	0,210
	0,120	0,230
Niere	0,150	0,180
	0,290	0,220

Obwohl die Tendenz zu leicht höheren Werten in Proben, die nicht säulenchromatographisch gereinigt wurden, gegeben ist, kann in diesen niedrigen Meßbereichen die Übereinstimmung als gut bezeichnet werden. Im endgültigen Aufarbeitungsgang wurde daher auf die säulenchromatographische Reinigung verzichtet.

Endgültiger Aufarbeitungsgang.

1,0 g Muskel-, Leber- oder Nierengewebe wurden, wie in Kapitel 3.1.2.4.1. beschrieben, in 5 ml Aqua dest. in einem Glasscintillationsgefäß homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 3 x 5 ml Petroläther extrahiert, unter Verwendung des bereits mehrfach erwähnten Laborschüttlers (siehe Kapitel 3.5.). Zur Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurden die Proben zunächst kurz abzentrifugiert (7 Minuten bei 2200 UpM) und danach mindestens zwei Stunden bei -30° C eingefroren. Danach konnte der Petroläther in konische Zentrifugengläser abgekippt werden.

Die Petrolätherextrakte wurden niedergetrocknet, entweder bei 40° C im Stickstoffstrom oder aber im Vacuumofen; daraufhin wurden sie in 3 ml 80 %-igem Methanol aufgenommen und dreimal gegen 2 ml Petroläther geschüttelt (30 Sekunden am Vortexmixer). Um eine bessere Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben

kurz abzentrifugiert. Der überstehende Petroläther wurde nacheinander in zwei weiteren Gläsern, die bereits 3 ml 80 %-iges Methanol enthielten, rückgewaschen. Diese Extraktion mit nachfolgender Rückwaschung des Petroläthers wurde noch zweimal wiederholt. Die in den drei Gläsern stationär verbliebenen Methanolextrakte wurden vereinigt und unter Stickstoff oder im Vacuumofen niedergetrocknet.

Nach erneuter Aufnahme in 1,0 ml Methanol wurden 0,1 ml zur Berechnung der Wiederfindung entnommen und die restliche Menge für den Radioimmunotest verwendet.

3.1.2.6. Berechnung der Wiederfindung

Über die Berechnung der Wiederfindung sollen Aufarbeitungsverluste korrigiert werden. Dazu wurde eine geringe, den Radioimmunotest nicht beeinflussende Menge an mit Tritium markiertem Hormon als "interner Standard" der biologischen Probe von Anfang an zugesetzt. Bei vorliegenden Untersuchungen wurden als interne Standards jeweils 2,6 pg 3 H-Östron $\approx$ 2000 dpm, 3,0 pg 3 H-Östradiol-17 β $\approx$ 2000 dpm bzw. 5,9 pg 3 H-Progesteron $\approx$ 4000 dmp eingesetzt. Der internen Standardisierung liegt die Annahme zugrunde, daß sich die nicht radioaktiven endogenen und die exogenen radioaktiven Hormone

während des Aufarbeitungsganges identisch verhalten. Zur eigentlichen Berechnung der Wiederfindung wurde am Ende des ganzen Aufarbeitungsganges (wie mehrmals beschrieben) der biologische Extrakt in 1,0 ml Methanol (GV) aufgenommen, wovon 0,1 ml als aliquoter Teil (AT) zur Erfassung der Radioaktivität entnommen wurden.

Für die Berechnung der Wiederfindung (WAF) für die in der Restprobe enthaltene Hormonmenge diente folgende Formel:

$$\text{WAF} = \frac{\text{cpm} \cdot (\text{GV} - \text{AT} \cdot 100)}{\text{CPM} \cdot \text{AT}} \quad (\%)$$

cpm = Impulse pro Minute; gezählt im aliquoten Teil (AT)

CPM = Impulse pro Minute des als internen Standard anfangs zugegebenen radioaktiven Hormons

GV = Gesamtvolumen Endextrakt

AT = aus GV entnommener aliquoter Teil.

Die Erfassung von cpm und CPM (siehe oben) geschah stets am gleichen Gerät unter identischen Zählbedingungen, wobei der Gerätenullwert berücksichtigt wurde, so daß eine Umrechnung in dpm (tatsächliche Zerfallsrate) nicht notwendig war. Mit Hilfe dieses Wiederfindungsfaktors konnte der im Radioimmunotest ermittelte

Östrogen- bzw. Progesteronwert auf die ursprüngliche, in der Probe vorhandene Östrogen- bzw. Progesteronmenge zurückgerechnet werden (siehe auch Behr 1973).

Eine solche Korrektur war bei der Untersuchung der Gewebe mit den langen und aufwendigen Arbeitsgängen nicht zu umgehen. Außerdem stellte die Wiederfindung einen Parameter für die Exaktheit der Arbeit während eines Aufarbeitungsganges dar.

3.2. Beurteilung der angewendeten Bestimmungsverfahren

Die angewandte Methodik baute auf bereits im Labor vorliegenden Erfahrungen auf (siehe auch Behr 1973; Hoffmann und Karg 1973). Neue Entwicklungsarbeiten wurden dahingehend geleistet, daß das Verfahren zur Östrogenbestimmung in Muskelgewebe auf Leber- und Nierengewebe übertragen werden konnte, wobei es gelang, die Technik erheblich zu verbessern und die Praktikabilität wesentlich zu steigern. Dies machte es möglich, daß eine größere Anzahl von Proben innerhalb eines Versuches bearbeitet werden konnte (siehe Kapitel 3.1.2.4.).

Die Methode zur Bestimmung von Östrogenen im Muskel-, Leber- und Nierengewebe wurde in vorliegender Arbeit intensiv auf ihre Zuverlässigkeit hin überprüft, wobei gleichzeitig die Grenzen der Methodik aufgezeigt werden konnten.

Auch das neu entwickelte Verfahren zur radioimmunologischen Östrogenbestimmung im Fett (Kapitel 3.1.2.4.2.2.) konnte im Rahmen vorliegender Arbeit auf seine Zuverlässigkeit hin überprüft werden, ebenso wie das Verfahren zur Bestimmung von Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe. Die analytischen Grenzen für den gegenwärtigen Stand der Methodik konnten ebenfalls aufgezeigt werden.

Für die Überprüfung der Zuverlässigkeit wurden als Kriterien die Spezifität, die Empfindlichkeit, die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit herangezogen; dabei ergeben sich natürliche Übergänge zwischen diesen einzelnen Zuverlässigkeitskriterien.

3.2.1. Überprüfung der Zuverlässigkeitskriterien

3.2.1.1. Spezifität

Die Spezifität ist bei radioimmunologischen Verfahren bei Verwendung von Standardsubstanzen von der Kreuzreaktion der verwendeten Antisera abhängig. Die in unseren Versuchen verwendeten Antisera zur Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron wiesen eine hohe Spezifität zu dem jeweiligen Steroid auf (siehe Kapitel 3.1.2.2.).

Im Gegensatz dazu enthalten aber biologische Extrakte, auch nach gründlicher Vorreinigung, noch vielfach Störsubstanzen, die den Radioimmunotest - also die Antigen-Antikörperreaktion - sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Das heißt, daß im Radioimmunotest mehr oder weniger Hormon gemessen werden kann, als tatsächlich vorhanden ist. Im Rahmen vorliegender Untersuchungen trat z.B. eine solche negative Beeinflussung, trotz eines relativ aufwendigen Extraktions- und Reinigungsganges bei Messung von Progesteron in der Leber auf, wie sich aus der Wiederfindung von nicht markiertem Progesteron, das der Leber vor der Extraktion zugesetzt worden war, ableiten ließ (siehe Kapitel 3.2.1.1.3. Tabelle 6 und Kapitel 3.2.1.3.2. Tabelle 32, 33, 34). Allgemein kann gesagt werden, daß - je nach Gewebe - mit mehr oder weniger Störsubstanzen zu rechnen ist, die eine unterschiedliche Zahl von Reinigungsschritten notwendig machen, um die notwendige Spezifität der Methode zu gewährleisten.

3.2.1.1.1. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Östrogenen im Muskel-, Leber- und Nierengewebe

Bei der Extraktion von Östrogenen aus Muskel-, Leber- und Nierengewebe wurde als erster wesentlicher Reinigungsschritt eine Trennung der phenolischen von der neutralen Fraktion durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2.4.1.). Bei diesem Schritt werden die bei pH 14 in wasserlöslicher Form vorliegenden phenolischen Östrogene von den nicht wasserlöslichen Verbindungen (nicht phenolische Steroide, Fette, Lipide) abgetrennt, die in der neutralen Fraktion, also dem organischen Lösungsmittel, verbleiben. Eine weitere Steigerung der Spezifität der Methodik ergab sich durch die säulenchromatographische Trennung von Östron und Östradiol-17 β .

In vorausgehenden Untersuchungen konnte Behr (1973) durch Vergleichsmessungen mit einem fluorimetrischen Verfahren die Spezifität dieses Extraktionsganges, d.h. der radioimmunologischen Östrogenbestimmung in Muskelgewebe, in dem Konzentrationsbereich um 5 ng/g Gewebe nachweisen. Da die in dem neu untersuchten Tiermaterial gefundenen Meßwerte stets unter 1,0 ng/g, meist sogar unter 0,5 ng/g lagen, erschien es wichtig, zur Spezifität der Methodik in diesem Größenbereich Aussagen machen zu können.

Referenzverfahren mit der entsprechenden Empfindlichkeit stehen immer noch nicht zur Verfügung. Die einzige Möglichkeit, wenigstens eine annähernde Aussage machen zu können, lag in der Bestimmung des Regressionskoeffizienten, nach Zugabe und Wiederfindung abgestufter Hormonmengen zum Gewebe. Ein linearer Regressionskoeffizient um 1 würde - bei quantitativer Wiederfindung der Zusätze - den Hinweis geben, daß bei der Messung des zugesetzten Hormons Störfaktoren beim Ablauf der Proteinbindungsreaktion nicht in Erscheinung getreten sind.

Dazu wurden jeweils 0,1 ; 0,2 ; 0,5 und 1,0 ng Östron bzw. Östradiol-17 β je 1,0 g Gewebe zugesetzt. Danach wurde die vollständige Extraktion durchgeführt. Nach Abzug des gewebeeigenen Hormongehaltes, der in mit-extrahierten Proben ohne Zusatz bestimmt wurde, war es möglich, die Wiederfindung der Zusätze zu ermitteln.

Die Versuche sind im Detail in den jeweils angegebenen Kapiteln bzw. Tabellen dargestellt. Hier sollen lediglich die berechneten Regressionskoeffizienten zur Beurteilung der Spezifität (siehe oben) herangezogen werden (siehe Tabelle 4).

Tab. 4 Regressionskoeffizienten: Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron- und Östradiol-17 β nach Zusatz zu Gewebe und Wasser (Werte ermittelt innerhalb einer Versuchsreihe)

Hormon	Muskel	Leber	Niere	Wasser
Östron	1,04 (11) ⁺	1,29 (14/1) ⁺⁺	1,37 (15/1) ⁺	0,93 (17) ⁺
	1,04 (12) ⁺	0,92 (14/2) ⁺⁺		0,97 (18) ⁺
Östradiol-17 β	0,97 (20) ⁺	1,27 (23/1) ⁺⁺	0,89 (24/1) ⁺	0,85 (26) ⁺
	1,01 (21) ⁺	0,72 (23/2) ⁺⁺		0,87 (27) ⁺

⁺ = Tabellen Nr. des entsprechenden Versuches in Kapitel 3.2.1.3.2.

⁺⁺ = Tabellen Nr. des entsprechenden Versuches im Tabellenanhang
Kapitel 8

Die Regressionskoeffizienten weisen, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, bei der Bestimmung von Östron eine ausgeglichene Tendenz auf. Die Werte schwanken zwischen 0,928 (bei Wasser) und 1,293 (bei Leber). Die relativ gleichmäßig verteilten Schwankungen nach oben und unten zeigen, daß es sich hier eher um Ungenauigkeiten der Methodik handelt, als um Mängel in der Spezifität.

Ähnliche Aussagen können für Östradiol-17 β gemacht werden. Mit Werten von 1,27 und 0,72 weisen die für die Wiederfindung in Lebergewebe errechneten Regressionskoeffizienten die größte Abweichung von 1 auf. Es dürfte sich aber auch hier um einen Mangel in der Genauigkeit und nicht um ein Spezifitätsproblem handeln, da die Abweichung nach positiv und negativ gleichermaßen auftritt. Insgesamt berechtigt das Ergebnis zu der Aussage, daß das Verfahren zur Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β im Muskel-, Leber- und Nierengewebe als spezifisch bezeichnet werden kann.

3.2.1.1.2. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Östrogenen im Fettgewebe

Zur Östrogenbestimmung im Fettgewebe ist zunächst zu sagen, daß auf Grund der Eigenheiten dieses Gewebes besondere Ansprüche an die Extraktion gestellt werden und diese daher nicht vergleichbar ist mit der Östrogenextraktion aus Muskel-, Leber- und Nierengewebe. Aber auch bei der Extraktion von Fett wurden als die Spezifität erhöhende Reinigungsschritte eine Trennung der phenolischen von der neutralen Fraktion und die säulenchromatographische Trennung von Östron und Östradiol-17 β eingebracht.

Außerdem wurden die in Kapitel 3.1.2.2. beschriebenen hochspezifischen Antisera verwendet. Da auch bei diesem Gewebe die Meßgrößen unter 1,0 ng/g lagen und Referenzverfahren mit entsprechender Empfindlichkeit somit nicht zur Verfügung standen, wurden auch hier zur Beurteilung der Spezifität die Regressionskoeffizienten herangezogen, die sich aus der Wiederfindung abgestufter dem Fett zugesetzter Hormonmengen ergaben. Das Ergebnis zeigt Tabelle 5.

Tab. 5 Regressionskoeffizienten: Wiederfindung abgestufter Mengen Östron und Östradiol-17 β nach Zugabe zu 1,0 g Fettgewebe (Werte ermittelt innerhalb einer Versuchsreihe)

Östron	Östradiol-17 β
1,131 (16/1) ⁺	1,203 (25/1) ⁺
0,711 (16/2) ⁺	1,044 (25/2) ⁺
0,795 (16/3) ⁺	1,135 (25/3) ⁺

⁺ = Tabellen Nr. des entsprechenden Versuches im Tabellenanhang Kapitel 8

Für die Messung von Östron zeigten sich stärkere Schwankungen in den Regressionskoeffizienten, als für die Bestimmung von Östradiol-17 β , wo sich ein Durchschnittswert $b = 1,122$ ergab.

Soweit auch hier Schwankungen in den errechneten Regressionskoeffizienten zu beobachten waren, deutet dies eher auf Probleme der Genauigkeit, als auf eine mangelnde Spezifität hin. Auch hier berechtigt das Ergebnis die Methode zur Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β im Fettgewebe als spezifisch zu bezeichnen.

3.2.1.1.3. Überprüfung der Spezifität bei der Messung von Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe

Auch für die Beurteilung der Spezifität des Verfahrens zur Bestimmung von Progesteron im Gewebe (Muskel, Leber, Niere) gilt, daß ein hochspezifisches Antiserum eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3.1.2.2.3.) sowie, daß spezielle Extraktionsschritte durchgeführt wurden. Im Kapitel 3.1.2.5.2. ist der Extraktionsgang für die alleinige Bestimmung von Progesteron, im Kapitel 3.1.2.5.1. der für eine gemeinsame Bestimmung mit den Östrogenen angegeben. Bei der alleinigen Bestimmung von Progesteron wurde als primäres Extraktionsmittel Petroläther verwendet; damit wurden von Anfang an lediglich mehr oder weniger unpolare Substanzen, also Progesteron in Verbindung mit Fetten und weiteren

Lipidanteilen extrahiert. Östrogene z.B. werden durch Petroläther praktisch nicht extrahiert (Murphy 1967, Johansson 1969).

Bei der gemeinsamen Bestimmung von Östrogenen und von Progesteron wurde dagegen Äther als Extraktionsmittel herangezogen. Für diesen Extraktionsgang kann mit gewissen Vorbehalten gesagt werden, daß nach der Trennung zwischen neutraler und phenolischer Fraktion, die organische, d.h. neutrale Fraktion, in etwa dem primären Petrolätherextrakt bei Anwendung des Extraktionsganges zur alleinigen Bestimmung von Progesteron entspricht. Bei beiden Extraktionsgängen wurden weiterhin durch eine Lösungsmittelverteilung zwischen Petroläther und 80 %-igem Methanol ein Großteil der vorhandenen Lipidanteile abgetrennt. Zur weiteren Steigerung der Spezifität wurde nun der Extrakt bei einigen Proben der säulenchromatographischen Reinigung unterzogen. Wie die in Kapitel 3.1.2.5.2. Tabelle: 3 wiedergegebenen Ergebnisse von Vergleichsmessungen mit und ohne Säulenchromatographie zeigen, werden die Meßgrößen durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt nur unwesentlich beeinflusst. Nachdem eine signifikante Spezifitätssteigerung durch diesen Schritt nicht festzustellen war, wurde daher auf die aufwendige Säulenchromatographie verzichtet.

Auch für Progesteron im Gewebe ergaben sich Meßwerte unter 1,0 ng/g. Auch hier stand noch keine geeignete Referenzmethode zur Verfügung, weshalb wiederum die Wiederfindung abgestufter Zusätze und die daraus ermittelten Regressionskoeffizienten als letztes Kriterium zur Beurteilung der Methodik herangezogen wurden.

Diese errechneten Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. (Die dazugehörigen Werte finden sich in Kapitel 3.2.1.3.2., bzw. Kapitel 8 und in den Tabellen die mit ⁺ gekennzeichnet hinter jedem Regressionskoeffizienten einzeln angegeben sind).

Tab. 6 Regressionskoeffizienten: Wiederfindung abgestufter Progesteronmengen (0,2; 0,5; 1,0 ng) nach Zusatz zu Gewebe und Wasser (Werte ermittelt innerhalb einer Versuchsreihe)

Muskel	Leber	Niere	Wasser
0,94 (29) ⁺	0,56 (32) ⁺	0,85 (35) ⁺	0,95 (36/1) ⁺
0,48 (30) ⁺	0,49 (33) ⁺		1,04 (36/2) ⁺

⁺ = Tabellen Nr. des entsprechenden Versuches in Kapitel 3.2.1.3.2. bzw. im Tabellenanhang Kapitel 8

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich wird, ergeben sich - wie zu erwarten war - für die Progesteronbestimmung in Wasser die besten Regressionskoeffizienten mit 0,95 und 1,04. Auch der Regressionskoeffizient errechnet für die Wiederfindung von Progesteron aus Nierengewebe liegt nahe bei 1,0 und gäbe einen Hinweis darauf, daß es sich um eine spezifische Messung handelt. Es handelt sich hier jedoch, wie aus Kapitel 3.2.1.3.2. und Kapitel 8 Tabelle 35 hervorgeht, um den einzigen Fall, wo der Regressionskoeffizient bei konstanter Unterschätzung der Zusätze einen falschen Hinweis auf die Spezifität gibt. Diese kann hier, wie Tabelle 39 zeigt, als noch ausreichend qualifiziert werden. Bei der Bestimmung von Progesteron im Muskelgewebe zeigen sich starke Schwankungen in den Regressionskoeffizienten, in der Leber weichen die errechneten Regressionskoeffizienten mit Werten von 0,49 und 0,55 deutlich von 1 ab. Für beide Gewebe, speziell jedoch für Leber, muß daher das zur Verfügung stehende Verfahren als nicht ausreichend bezeichnet werden. Wie die in Kapitel 3.2.1.3.2. und Kapitel 8 Tabelle 34 angegebenen Wiederfindungswerte im Lebergewebe jedoch zeigen, ergibt sich diese Depression in der Regressionsgeraden hauptsächlich durch die geringe Wiederfindung der höheren Progesteronzusätze (0,5; 1,0 ng), während die

Wiederfindung von 0,2 ng noch als relativ gut bezeichnet werden kann. Soweit die im Ergebnisteil für Lebergewebe angegebenen Progesteronwerte unter oder noch bei 0,2 ng liegen, können sie daher als relativ spezifisch angesehen werden. Höhere Progesteronwerte sind nach diesen Untersuchungen nur beim direkten Vergleich Kontrollgruppe - Behandlungsgruppe in gewissem Sinne noch aussagefähig.

3.2.1.2. Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ist gegeben durch die kleinste Menge, die noch von Null unterscheidbar ist. Diese Grenze ist einmal bedingt durch den Bereich und die Exaktheit der Standardkurve, sowie von der Ablesegenauigkeit des Auges. Nach diesen Kriterien liegt diese kleinste Menge bei der Messung von Östron und Östradiol-17 β , wie auch von Behr (1973) angegeben, bei 10 pg. Die entsprechende Aussage kann für Progesteron gemacht werden. Diesem Wert übergeordnet ist jedoch der Reagentienleerwert. Er wird ermittelt nach Durchführung des ganzen Aufarbeitungsganges, jedoch ohne Gewebszugabe, mit nachfolgender radioimmunologischer Messung. Der radioimmunologisch ermittelte Wert wird dann ausgedrückt in pg Östron-, Östradiol-17 β - oder Progesteronäquivalenten.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen wurden bei zahlreichen Untersuchungen zur Kontrolle die Reagentienleerwerte überprüft. Das Ergebnis dieser Überprüfungen ist in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt:

Tab. 7 Reagentienleerwerte bei Anwendung der beschriebenen Extraktionsgänge

Parameter	Bestimmung von		
	Östron ^x	Östradiol-17 β ^x	Progesteron ^{xx}
n	49	53	24
$\bar{x}$	0,017	0,014	0,023
s	0,016	0,016	0,017
Vk (%)	90,53	113,95	75,24
S $\bar{x}$	0,002	0,002	0,003

x = (für Muskel-, Leber-, Nieren- und Fettgewebe)

xx = (für Muskel-, Leber- und Nierengewebe)

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, kommt man bei Berücksichtigung der positiven Standardabweichung auf eine unterste Meßgrenze von 0,033 ng bei Östron, von 0,030 ng bei Östradiol-17 β und von 0,040 ng bei Progesteron.

Da der jeweils ermittelte Reagentienleerwert bei Berechnung der tatsächlichen Hormonmenge von dem für die biologische Probe aus der Eichkurve abgelesenen Wert abgezogen und die so erhaltene Zahl mit dem ermittelten Wiederfindungsfaktor korrigiert wurde, war es auch möglich, daß Endwerte erhalten wurden, die noch unterhalb der Reagentienleerwertgrenze lagen.

3.2.1.3. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit

Für die Überprüfung dieser Zuverlässigkeitskriterien wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

- a) Wiederfindung von radioaktivem Hormon nach Durchführung des gesamten Extraktionsganges.
- b) Wiederfindung abgestufter Hormonmengen nach Durchführung des gesamten Extraktionsganges.
- c) Extraktion unterschiedlicher Gewebsmengen.

Während im Rahmen der Bestimmung von Östrogenen alle drei Parameter überprüft wurden, konnte zur Charakterisierung der Progesteronbestimmung lediglich die ersten beiden Parameter überprüft werden.

3.2.1.3.1. Wiederfindung von radioaktiv markiertem

Hormon

Zur Erfassung dieses Kriteriums für die Genauigkeit wurde die bei allen durchgeführten Versuchen berechnete Wiederfindung des radioaktiven internen Standards herangezogen. Lediglich Versuche, bei denen die Wiederfindung unter 30 % lag, wurden grundsätzlich nicht ausgewertet. Das Ergebnis für die Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron in den einzelnen Geweben und im Wasser ist in den Tabellen 8, 9 und 10 zusammengefaßt. Angegeben sind die Anzahl der durchgeführten Versuche (= n), die Durchschnittswerte (= $\bar{x}$) und die statistischen Parameter Streuung (= S), Variationskoeffizient (= V k %) und Standardabweichung des Mittelwertes (= S $\bar{x}$).

Tab. 8 Prozentuale Wiederfindung von radioaktivem Östron aus verschiedenen Geweben und Wasser

Parameter	Muskel	Leber	Niere	Fett	Wasser
n	192	109	52	88	77
$\bar{x}$	54,1	47,9	53,8	62,1	60,5
S ($\pm$)	10,5	8,2	7,4	9,1	8,4
V k (%)	21,3	18,8	15,2	16,2	15,3
S $\bar{x}$	1,1	0,8	1,0	1,0	0,9

Tab. 9 Prozentuale Wiederfindung von radioaktivem
Östradiol-17 β aus verschiedenen Geweben und Wasser

Parameter	Muskel	Leber	Niere	Fett	Wasser
n	75	109	42	72	77
$\bar{x}$	47,2	49,5	47,0	65,2	51,2
S ($\pm$)	9,2	9,9	8,2	12,7	8,4
Vk (%)	21,4	22,0	19,2	21,4	17,9
S $\bar{x}$	1,1	1,0	1,3	1,5	1,0

Tab. 10 Prozentuale Wiederfindung von radioaktivem
Progesteron aus verschiedenen Geweben und Wasser

Parameter	Muskel	Leber	Niere	Wasser
n	66	81	55	67
$\bar{x}$	55,6	52,3	54,8	72,7
S ($\pm$)	7,2	7,2	8,9	6,7
Vk (%)	14,2	15,1	17,1	10,1
S $\bar{x}$	0,9	0,8	1,2	0,8

Wie die Tabellen Nr. 8, 9 und 10 zeigen, schwanken die Wiederfindungswerte bei den Verfahren zur Bestimmung der Östrogene zwischen 47,0 % für Östradiol-17 β bei Niere und 65,2 % für Östradiol-17 β bei Fettgewebe. Allgemein kann gesagt werden, daß sich bei den Östrogenen aus Fettgewebe die beste Wiederfindung ergab.

Auf Grund der starken Streuungen ergeben sich jedoch keine gesicherten Unterschiede zur Gewebsausbeute in den anderen Geweben. Auf Grund dieser Streuungen sowie der Variationskoeffizienten, die zwischen 15,2 % und 22,0 % schwanken, ist diese interne Standardisierung zur Korrektur der Aufarbeitungsverluste absolut notwendig. Die gleiche Aussage läßt sich für Progesteron machen, bei dem die schlechteste Wiederfindung bei 52,3 % für Leber und die beste Wiederfindung mit 72,7 % für Wasser liegt.

3.2.1.3.2. Wiederfindung abgestufter Hormonmengen

Es wurden jeweils 0,1 ; 0,2; 0,5 und 1,0 ng Östron, Östradiol-17 β bzw. Progesteron zu 1 g Muskel, 1 g Leber, 1 g Niere oder 5 ml Wasser zugesetzt und nach Durchführung des gesamten Extraktionsganges die Wiederfindung ermittelt. Entsprechend wurde die Wiederfindung von Östron und Östradiol-17 β nach Zugabe zu 0,5 g Fett ermittelt. Bei der Berechnung der Wiederfindung wurden stets der gewebeeigene Hormonwert bzw. Reagentienleerwert berücksichtigt. Um bei der Vielzahl der Ergebnisse die Übersicht zu wahren, wurde wie folgt vorgegangen: Die für die einzelnen Gewebe und Wasser ermittelten Wiederfindungswerte wurden für jedes Hormonbestimmungsverfahren eigens

zusammengestellt. In den Tabellen sind lediglich die Anzahl der durchgeführten Versuche (n), die Durchschnittswerte ($\bar{x}$) und die statistischen Parameter - Streuung (S), Variationskoeffizient ($V_k \%$) und die Standardabweichung des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) - angegeben. Die dazugehörigen Einzelwerte finden sich in den Tabellen 11 - 36 im Anhang.

Im folgenden wurde als Maßstab für die Genauigkeit die durchschnittliche Wiederfindung ($\bar{x}$) herangezogen, während die beiden anderen Parameter $V_k \%$ und S primär für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit herangezogen wurden. Selbstverständlich ist auf Grund der hier angestellten Versuchsdurchführungen eine absolute Abgrenzung zwischen den beiden Parametern (Genauigkeit und Reproduzierbarkeit) nicht möglich, worauf oben schon hingewiesen wurde. Auf die Zusammenhänge zwischen n , $\bar{x}$ und V_k wird in der Diskussion (Kapitel 5) noch ausführlich eingegangen werden.

Wiederfindung von Östron

Die Ergebnisse der Wiederfindung von Östron aus Muskel-gewebe sind in den Tabellen 11, 12, 13 dargestellt, wobei die Tabellen 11 und 12 jeweils das Ergebnis eines einzelnen im 5-er Ansatz durchgeführten Versuches wiedergeben.

In Tabelle Nr. 13 sind die in Tabelle Nr. 11 und 12 genannten, sowie weitere Östronzusatzergebnisse, die für Muskelgewebe ermittelt wurden, zusammengefaßt. Aus den drei Tabellen (11,12,13) geht hervor, daß - gemessen am Durchschnittswert $\bar{x}$ - die Wiederfindung und damit die Genauigkeit allgemein als gut bezeichnet werden kann. Die "Sollwerte" (zugesetzte Hormonmenge) wurden knapp unter- oder überschritten. Die weiteren in der Tabelle erfaßten statistischen Parameter zeigen jedoch, daß sich trotz dieser guten durchschnittlichen Wiederfindung relativ starke Schwankungen bei der Berechnung von S und V_k ergaben. So lagen die Werte für den Variationskoeffizienten bei der Wiederfindung von 0,1 ng Östron zwischen 18,8 % und 45,9 %.

Niedriger liegende Variationskoeffizienten zwischen V_k = 3,3 % und V_k = 21,8 % ergaben sich für die Wiederfindung der höheren Östronzusätze (0,2 ng bis 1,0 ng). Dieses für zwei Einzelversuche errechnete Ergebnis der Wiederfindung bestätigt sich auch bei der Zusammenfassung aller "Wiederfindungsergebnisse" für Östron aus Muskelgewebe, das in Tabelle 13 dargestellt ist. Während für 0,1 ng Zusatz ein Variationskoeffizient von 30,3 % errechnet wurde, liegt er für die Wiederfindung der übrigen Zusätze zwischen 11,7 und 17,5 %.

Dieses Ergebnis zeigt, daß besonders in den unteren

Konzentrationsbereichen ($< 0,1$ ng) die Reproduzierbarkeit der Methodik als bestenfalls befriedigend bezeichnet werden kann. Eine akzeptable (gute) Genauigkeit wird sich, wie aus den Tabellen 11, 12 und 13 hervorgeht, nur dann erreichen lassen, wenn Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden; für die höheren Konzentrationsbereiche (0,2 - 1,0 ng) ergibt sich eine Reproduzierbarkeit, die bei Betrachtung der Meßgrößen als gut bezeichnet werden muß. Sicherlich muß auch ein Teil der festgestellten Variabilität auf die Inhomogenität des Ausgangsmaterials (ungleiche Anteile an Bindegewebe und Fettgewebe) zurückgeführt werden, was sich ja besonders in den niedrigen Konzentrationsbereichen bemerkbar macht.

Unterschiede zwischen der Intra-assay-Variabilität (Variabilität innerhalb einer Versuchsreihe) und der Inter-assay-Variabilität (Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen) waren bei diesen Untersuchungen nicht festzustellen.

Tab. 11 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk %	$\bar{Sx}$
0,1	5	0,119	0,022	18,8	0,010
0,2	5	0,212	0,019	9,2	0,008
0,5	5	0,532	0,076	14,3	0,034

Tab. 12 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk %	$S\bar{x}$
0,1	5	0,095	0,043	45,9	0,019
0,2	5	0,226	0,049	21,8	0,022
0,5	5	0,451	0,014	3,3	0,006
1,0	5	1,051	0,083	7,9	0,037

Tab. 13 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Einzelergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk %	$S\bar{x}$
0,1	14	0,108	0,032	30,3	0,008
0,2	14	0,214	0,038	17,8	0,010
0,5	14	0,501	0,058	11,7	0,015
1,0	7	0,994	0,161	16,2	0,060

Die Ergebnisse der Erfassung abgestufter Östronzusätze zu Leber- und Nierengewebe sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefaßt. Da, wie auch aus den beiden Tabellen zu ersehen ist, bei der Bestimmung von Östron in diesen

Gewebe noch Probleme auftraten, erschien es hier nicht sinnvoll, Ergebnisse von Einzelversuchen darzustellen, um zwischen Inter- und Intra-assay-Variabilität zu unterscheiden.

Während bei Nierengewebe die durchschnittliche Wiederfindung und damit die Genauigkeit noch relativ gut war, zeigen die entsprechenden Wiederfindungsdaten im Lebergewebe auf, daß -zumindest in Konzentrationen bis 0,5 ng - die Genauigkeit als nicht befriedigend bezeichnet werden muß. Bei allen drei Zusätzen (0,1 ng; 0,2 ng; 0,5 ng) kommt es nach radioimmunologischer Messung zu einer "Überschätzung" der zugegebenen Werte.

Werden die Variationskoeffizienten als Maßstab für die Reproduzierbarkeit herangezogen, so kann diese bei der Östronbestimmung im Nierengewebe ab Konzentrationen von 0,2 ng/g ($V_k = 20,9 \% - 29,8 \%$) und im Lebergewebe ab Konzentrationen von 0,5 ng/g ($V_k = 22,9 \% - 30,6 \%$) als akzeptabel angesehen werden.

Anders als bei der Bestimmung von Östron in Muskel- und Fettgewebe bzw. im Wasser (siehe Tabellen 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19) zeigt bei der Wiederfindung von Östron aus Leber- und Nierengewebe eine deutliche Abhängigkeit des Variationskoeffizienten von der Menge des zugesetzten Östrons. Die Werte für den Variationskoeffizienten fallen konstant von 88,5 % (0,1 ng Zusatz) auf 20,9 % (1,0 ng Zusatz) beim Nierengewebe bzw. von 70,3 % (0,1 ng Zusatz)

auf 22,9 % (1,0 ng Zusatz) bei Lebergewebe ab.

Die noch vorhandenen Probleme bei der Bestimmung von Östron im Lebergewebe sind nicht auf ein inhomogenes Ausgangsmaterial zurückzuführen (gerade bei der Leber ist die Gewebszusammensetzung sehr homogen); es scheinen hier noch echte methodenbedingte Schwierigkeiten vorzuliegen.

Tab. 14 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller durchgeführten Versuche

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	S $\bar{x}$
0,1	16	0,184	0,129	70,2	0,032
0,2	20	0,292	0,182	62,2	0,040
0,5	24	0,660	0,202	30,6	0,041
1,0	18	1,089	0,249	22,9	0,058

Tab. 15 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	S $\bar{x}$
0,1	13	0,119	0,105	88,5	0,029
0,2	8	0,244	0,073	29,8	0,025
0,5	13	0,477	0,131	27,6	0,036
1,0	7	1,325	0,277	20,9	0,104

Die entsprechenden Versuche zur Wiederfindung abgestufter Östronmengen im Fettgewebe sind in der Tabelle 16 dargestellt. Das Ergebnis der jeweils wiedergefundenen Östronzusätze ist zufriedenstellend, die Mittelwerte ($\bar{x}$) liegen sehr nahe bei den zu erreichenden "Sollwerten", es kann somit von einer guten Genauigkeit gesprochen werden. Der Variationskoeffizient liegt durchschnittlich bei 30,8 %. Die relative Konstanz von V_k weist darauf hin, daß hier keine Abhängigkeiten seitens der Meßgröße bestehen. Insgesamt kann auch hier das Ergebnis als zufriedenstellend bezeichnet werden.

Tab. 16 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Fett zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	V _k (%)	$S_{\bar{x}}$
0,2	15	0,186	0,054	29,4	0,014
0,5	15	0,491	0,140	28,5	0,036
1,0	12	1,013	0,350	34,5	0,101

Die Ergebnisse der Wiederfindung von Östron aus Wasser sind in den Tabellen 17, 18 und 19 wiedergegeben. Die Tabellen 17 und 18 geben jeweils das Ergebnis eines

einzelnen Versuchen wieder, während in Tabelle 19 alle Ergebnisse zusammengefaßt wurden. Die in den Tabellen angegebenen Werte zeigen, daß bei der Bestimmung von Östron aus Wasser erwartungsgemäß eine gute Genauigkeit erzielt worden ist. Für den Variationskoeffizienten ergaben sich hier gleichbleibende Schwankungen zwischen 9,3 % und 33,1 %. Unterschiede zwischen der Inter- und der Intra-assay-Variabilität waren nicht zu verzeichnen.

Nachdem Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Östronmessung im Wasser etwa gleich zu beurteilen sind, wie bei der Messung von Östron im Muskel- oder Fettgewebe, kann für diese beiden Gewebe festgestellt werden, daß bei der radioimmunologischen Messung von Östron keine Störfaktoren mehr vorliegen, die von der Gewebsextraktion herkommen. Die bei der Bestimmung von Östron im Muskel- und Fettgewebe bzw. im Wasser auftretenden methodischen Ungenauigkeiten müssen damit erklärt werden, daß die verwendeten Reagentien - trotz sorgfältiger Reinigung derselben - eingebracht werden. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, daß die mitextrahierten Reagentienleerwerte Schwankungen von Versuch zu Versuch aufwiesen (0 - 0,033 ng Östronäquivalente) (siehe Tabelle 7). Dagegen erscheint eine Verbesserung der Methodik in bezug auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Messung von Östron im Leber- und Nierengewebe noch

angezeigt, dürfte aber ohne Einführung grundlegender neuer methodischer Schritte nicht möglich sein.

Tab. 17 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$\bar{s}_x$
0,1	5	0,109	0,036	33,1	0,016
0,2	5	0,175	0,042	24,2	0,018
0,5	5	0,523	0,048	9,3	0,021
1,0	3	0,919	0,177	19,3	0,102

Tab. 18 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$\bar{s}_x$
0,1	5	0,083	0,022	26,9	0,010
0,2	5	0,240	0,022	9,5	0,010
0,5	5	0,477	0,058	12,2	0,026
1,0	5	0,983	0,181	18,5	0,081

Tab. 19 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	22	0,090	0,024	26,6	0,005
0,2	25	0,177	0,053	30,0	0,010
0,5	26	0,490	0,078	16,0	0,040
1,0	31	0,940	0,224	23,9	0,040

Wiederfindung von Östradiol-17 β

Die Ergebnisse der Wiederfindung von Östradiol-17 β zu Muskelgewebe sind in den Tabellen 20, 21 und 22 wiedergegeben. Die Tabellen 20 und 21 zeigen je einen im 5-er Ansatz durchgeführten Einzelversuch, während die Tabelle 22 sowohl die in Tabelle 20 und 21 genannten, als auch alle weiteren Östradiolzusatzergebnisse für Muskelgewebe zusammenfaßt. Wie aus den in den drei Tabellen dargestellten Wiederfindungsergebnisse für $\bar{x}$ hervorgeht, liegen diese - mit einer Ausnahme - sehr nahe bei den "Sollwerten", was für eine gute Genauigkeit der Methode spricht. Der in Tabelle 21 angegebene Wiederfindungswert von 0,342 ng bei Zugabe von 0,5 ng dürfte eine Ausnahme darstellen, da 0,5 ng sowohl in

dem in Tabelle 20 genannten Versuch mit 0,505 ng, als auch in den weiteren Einzelversuchen stets besser wiedergefunden wurde, wie auch aus dem Durchschnittswert von 0,435 ng für die gesamte Wiederfindung von 0,5 ng Östradiol-17 β zu Muskelgewebe hervorgeht (siehe Tabelle 22).

Für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurde wieder als Parameter der Variationskoeffizient herangezogen. Mit einer Ausnahme (Tabelle 21 - 0,2 ng Zusatz) ergaben sich Variationskoeffizienten, die zwischen 7,6 % und 26,0 % lagen. Bei Berücksichtigung aller Versuche ergibt sich ein durchschnittlicher Wert für Vk von ca. 18 %, der bei Berücksichtigung des niedrigen Meßbereichs als gut zu bezeichnen ist. Unterschiede in der Inter- und Intra-assay-Variabilität sind nur andeutungsweise zu sehen, wie aus den in den Tabellen 20 und 21 wiedergegebenen Werten für die Variationskoeffizienten zu ersehen ist. Insgesamt kann das Ergebnis als gut bezeichnet werden.

Tab. 20 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Zusatz (ng)	Wiederfindung (in ng)				
	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S_{\bar{x}}$
0,1	5	0,108	0,013	12,0	0,005
0,2	5	0,235	0,027	11,7	0,012
0,5	5	0,505	0,085	16,8	0,038

Tab. 21 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	2	0,072			
0,2	5	0,172	0,071	41,5	0,032
0,5	5	0,342	0,037	11,0	0,016
1,0	5	0,981	0,076	7,7	0,034

Tab. 22 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	13	0,095	0,017	18,2	0,004
0,2	16	0,203	0,052	26,0	0,013
0,5	16	0,435	0,087	20,0	0,021
1,0	7	0,959	0,072	7,6	0,027

Die Ergebnisse der Wiederfindung von Östradiol-17 β aus Leber- und Nierengewebe sind in den Tabellen 23 und 24 zusammengefaßt. (Da bei diesen Untersuchungen zahlreiche Doppel- oder Dreifachbestimmungen in einem Versuchsansatz durchgeführt wurden, erschien es nicht

sinnvoll, zwischen Inter- und Intra-assay-Variabilität unterscheiden zu wollen.) Wie aus den in den beiden Tabellen 23 und 24 wiedergegebenen Durchschnittswerten $\bar{x}$ hervorgeht, kann die Wiederfindung und damit die Genauigkeit in jedem Fall als gut bezeichnet werden. Im Gegensatz zur Wiederfindung von Östron im Leber- und Nierengewebe (siehe Tabelle 14 und 15) ergeben sich für die Bestimmung von Östradiol-17 β aus Leber- und Nierengewebe relativ niedrig liegende Variationskoeffizienten zwischen $V_k = 10,9 \%$ und $V_k = 28,9 \%$, lediglich für die Wiederfindung von 0,1 ng Östradiol-17 β aus Lebergewebe wurde ein Variationskoeffizient von 41,5 % errechnet. Das Ergebnis zeigt also, daß bei Konzentrationen von weniger als 0,1 ng Östradiol-17 β pro g Lebergewebe mit einer noch unzureichenden Reproduzierbarkeit zu rechnen ist, ansonsten kann diese für die Bestimmung von Östradiol-17 β in Leber- und Nierengewebe als befriedigend bezeichnet werden.

Tab. 23 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	Wiederfindung (in ng)				
	n	$\bar{x}$	S	$V_k (\%)$	$S_{\bar{x}}$
0,1	19	0,090	0,037	41,5	0,008
0,2	23	0,174	0,031	17,9	0,006
0,5	24	0,476	0,081	17,0	0,016
1,0	16	1,044	0,250	23,9	0,062

Tab. 24 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	10	0,073	0,021	28,9	0,006
0,2	14	0,196	0,055	28,2	0,014
0,5	12	0,516	0,056	10,9	0,016
1,0	11	1,021	0,199	19,5	0,060

Die im Fettgewebe durchgeführten Untersuchungen sind zusammenfassend in der Tabelle 25 wiedergegeben. Die Werte für die Wiederfindung von Östradiol-17 β liegen relativ nahe am "Sollwert" und sprechen somit für eine zufriedenstellende Genauigkeit des Verfahrens. Auch die errechneten Variationskoeffizienten (Durchschnittswert für $Vk = 23,35\%$) sprechen noch für eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Methode.

Tab. 25 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fett zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	18	0,184	0,061	33,4	0,014
0,5	15	0,530	0,098	18,5	0,025
1,0	14	1,174	0,212	18,1	0,056

Die Ergebnisse der Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β aus Wasser sind in den Tabellen 26, 27 und 28 wiedergegeben, wobei die Tabellen 26 und 27 jeweils das Ergebnis eines einzelnen Versuches wiedergeben, die Tabelle 28 aber alle Versuchsdaten - auch die in den Tabellen 26 und 27 aufgeführten - zusammenfaßt. Ähnlich wie für die Bestimmung von Östron gilt auch hier, daß - zumindest theoretisch - das Verfahren zur Bestimmung von Östradiol-17 β im Wasser als am zuverlässigsten einzustufen ist. Tatsächlich ergeben sich auch hier für die Wiederfindung der Zusätze Durchschnittswerte, die nahe bei den "Sollwerten" liegen, aber auch nicht besser als die Wiederfindung von Östradiol-17 β aus Gewebe einzustufen sind. Ähnliches kann für die Reproduzierbarkeit, gemessen am Variationskoeffizienten, gesagt werden. Deutliche Unterschiede zwischen einer Inter- und Intra-assay-Variabilität zeigten sich nicht.

Insgesamt kann also die Methodik zur Bestimmung von Östradiol-17 β in Geweben als zuverlässig bezeichnet werden. Noch vorhandene Mängel, die besonders das Zuverlässigkeitskriterium Reproduzierbarkeit betreffen, können nicht auf Störsubstanzen zurückgeführt werden, die vom Gewebsextrakt herrühren und den Radioimmuno-test stören. Vielmehr ist daran zu denken, daß durch

den umfangreichen Aufarbeitungsgang und Störsubstanzen in den verwendeten Materialien und Reagentien, diese Ungenauigkeiten bedingt werden.

Tab. 26 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	5	0,075	0,006	8,9	0,002
0,2	5	0,186	0,024	13,3	0,011
0,5	5	0,476	0,168	35,3	0,075
1,0	3	0,840	0,120	14,4	0,069

Tab. 27 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	5	0,082	0,017	20,6	0,007
0,2	5	0,157	0,013	8,4	0,005
0,5	5	0,486	0,041	8,5	0,018
1,0	5	0,856	0,224	26,2	0,100

Tab. 28 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,1	24	0,092	0,033	35,6	0,006
0,2	22	0,174	0,026	15,3	0,005
0,5	26	0,501	0,086	17,0	0,016
1,0	33	1,032	0,206	20,0	0,035

Wiederfindung von Progesteron

Die Wiederfindungsergebnisse für Progesteron nach Zugabe zu Muskelgewebe sind in den Tabellen 29, 30 und 31 dargestellt. Die Tabellen 29 und 30 zeigen jeweils das Ergebnis eines im 5-er Ansatz durchgeführten Versuches, während in Tabelle 31 wieder die in den Tabellen 29 und 30 aufgezeigten Ergebnisse, als auch die weiterer Einzelversuche zusammengefaßt sind. Besonders aus den Tabellen 29 und 30 wird ersichtlich, daß die Wiederfindung von Versuch zu Versuch stärkeren Schwankungen unterliegen war. In Tabelle 29 und 30 zeigen sich diese Schwankungen besonders bei der Wiederfindung von 1,0 ng, die

einmal bei 0,589 ng und einmal bei 0,931 ng liegt. Bei der Zusammenfassung aller Ergebnisse der Wiederfindung (Tabelle 31) wird eine deutliche und konstante Unterschätzung aller Zusätze sichtbar. Die mit der angewandten Methodik erreichte Genauigkeit kann hier gerade noch als akzeptabel bezeichnet werden. Auch hier wurde für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Variationskoeffizient herangezogen, für den sich ein Durchschnittswert von $V_k = 27,9 \%$ errechnete. Für die Progesteronbestimmung im Muskelgewebe kann daher gesagt werden, daß bei gerade noch akzeptabler Genauigkeit eine relativ gute Reproduzierbarkeit erzielt wurde.

Tab. 29 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskel zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Zusatz (ng)	Wiederfindung (in ng)				
	n	$\bar{x}$	s	$V_k (\%)$	$\bar{s}_x$
0,2	5	0,150	0,033	22,3	0,014
0,5	5	0,633	0,073	11,6	0,032
1,0	5	0,931	0,059	6,4	0,026

Tab. 30 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskel zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$\bar{s}\bar{x}$
0,2	5	0,199	0,022	11,5	0,010
0,5	5	0,365	0,038	10,4	0,017
1,0	5	0,589	0,152	25,8	0,068

Tab. 31 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskel zugesetzt
Zusammenfassung aller Versuche

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$\bar{s}\bar{x}$
0,2	12	0,160	0,047	29,5	0,013
0,5	12	0,483	0,141	29,3	0,040
1,0	12	0,774	0,193	25,0	0,055

Die Ergebnisse zur Erfassung von Progesteronzusätzen
im Leber- und Nierengewebe sind in den Tabellen 32
bis 35 zusammengefaßt. Die Tabellen 32 und 33 geben
jeweils 2 Einzelversuche wieder, die im 5-er Ansatz
im Lebergewebe durchgeführt wurden, während in der

Tabelle 34 die Zusammenfassung aller Zusatzergebnisse der Progesteronmessung im Lebergewebe dargestellt sind. Wie aus Tabelle 34 hervorgeht, zeigt sich für Lebergewebe umgekehrt proportional zur Menge des Zusatzes von Progesteron eine ansteigende Unterschätzung der Zusätze. Dies bestätigten auch die für die beiden in den Tabellen 32 und 33 dargestellten Versuche errechneten Regressionskoeffizienten (siehe Tabelle 6), die hier mit den Werten $b = 0,555$ (= Versuch Tabelle 32) bzw. $b = 0,490$ (= Versuch Tabelle 33) erheblich vom Idealwert 1 abweichen.

Beispielsweise werden 0,2 ng Progesteronzusatz mit ca. 0,17 ng, d.h. 15 % Fehler, noch relativ gut wiedergefunden. Dagegen liegt der Fehler bei der Wiederfindung von 1,0 ng bereits bei durchschnittlich 33 %. Trotz akzeptabler Reproduzierbarkeit (Vk 25 - 29 %) wird die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens nur bedingt qualitative und quantitative Aussagen zulassen. Noch negativer muß die Aussage über die Methode zur Bestimmung von Progesteron im Nierengewebe formuliert werden. Obwohl hier der Regressionskoeffizient mit $b = 0,850$ nicht allzu stark von 1 abweicht, kommt es, wie Tabelle 35 zeigt, zu einer erheblichen Unterschätzung der Zusätze. Neben dieser ungenügenden Genauigkeit muß auch die Reproduzierbarkeit mit Werten für Vk zwischen 30 % und 125 % als ungenügend bezeichnet werden.

Tab. 32 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Leber zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	5	0,230	0,035	15,6	0,016
0,5	5	0,349	0,105	30,3	0,047
1,0	5	0,667	0,205	30,8	0,092

Tab. 33 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Leber zugesetzt
Ergebnisse eines Versuches

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	5	0,145	0,031	21,7	0,014
0,5	5	0,299	0,068	22,9	0,030
1,0	5	0,539	0,076	14,2	0,034

Tab. 34 Überprüfung der Wiederfindung abgestufter
Mengen von Progesteron zu 1 g Leber
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	12	0,169	0,064	38,2	0,018
0,5	12	0,302	0,094	31,2	0,027
1,0	12	0,673	0,220	32,7	0,065

Tab. 35 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Niere zugesetzt

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	4	0,087	0,109	125,0	0,054
0,5	5	0,394	0,118	30,1	0,053
1,0	5	0,780	0,292	37,4	0,130

Bei Zugabe von abgestuften Mengen Progesteron zu Wasser wurden die in Tabelle 36 angegebenen Werte wiedergefunden. Da in diesen Versuchen kein Unterschied zwischen der Inter- und Intra-assay-Variabilität festzustellen war, wurde auf eine Darstellung der Ergebnisse einzelner Versuchsreihen verzichtet. Erwartungsgemäß lagen hier die Wiederfindungen sehr nahe am "Sollwert". Bei guter Genauigkeit muß auch hier die Reproduzierbarkeit bei Werten für den Variationskoeffizienten zwischen $V_k = 8 \%$ und $V_k = 21 \%$ als gut bezeichnet werden.

Wie schon für die Bestimmung für Östron und Östradiol-17 β in Wasser ausgesagt wurde, müssen auch hier die noch vorhandenen relativ geringen Abweichungen vom "Sollwert" auf die Länge des Extraktionsganges und möglicherweise noch vorhandene Störsubstanzen in den Materialien und

Reagentien zurückgeführt werden. Keinesfalls kann jedoch die mangelhafte Zuverlässigkeit, die bei der Bestimmung von Progesteron - besonders im Leber- und Nierengewebe - festgestellt wurde, auf diese Tatsachen zurückgeführt werden. Hier scheint es sich um echte Störfaktoren zu handeln, die aus dem Gewebe mitextrahiert und durch den weiteren Extraktionsgang nicht abgetrennt wurden und eine die Proteinbindungs-Reaktion hemmende Wirkung ausüben.

Tab. 36 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron zugesetzt zu Wasser

Wiederfindung (in ng)					
Zusatz (ng)	n	$\bar{x}$	S	Vk (%)	$S\bar{x}$
0,2	15	0,220	0,041	18,6	0,010
0,5	16	0,514	0,108	21,1	0,027
1,0	15	1,013	0,081	8,0	0,020

3.2.1.3.3. Bestimmung endogener Östrogenkonzentrationen in unterschiedlichen Gewebsmengen

In einem letzten Versuch zur Charakterisierung der Methodik zur Bestimmung von Östrogenen wurden Östron und Östradiol-17 β jeweils in 1 g und 2 g Muskel- und Lebergewebe bestimmt. Das Ergebnis zeigen die Tabellen 37 und 38.

Tab. 37 Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β
in 1 g und 2 g Muskelgewebe

Hormon	g Gewebe		ng Östrogen (Mittelwerte $\pm$ S)	
		n	$\bar{x}$	S
Östron	1	9	0,004	0,005
	2	5	0,015	0,006
Östradiol- -17 β	1	9	0,007	0,014
	2	6	0,021	0,026

Tab. 38 Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β
in 1 g und 2 g Lebergewebe

Hormon	g Gewebe		ng Östrogen (Mittelwerte $\pm$ S)	
		n	$\bar{x}$	S
Östron	1	5	0,018	0,012
	2	3	0,080	0,015
Östradiol- -17 β	1	5	0,056	0,012
	2	3	0,122	0,020

In jedem Fall werden bei der Extraktion der höheren Gewebsmengen höhere Meßwerte erzielt, wobei sich jedoch - bei Betrachtung der Durchschnittswerte $\bar{x}$ - nur für die Bestimmung von Östradiol-17 β aus Lebergewebe eine lineare Beziehung ergibt. Bei diesem Versuch wurden mit 56 pg/g Gewebe die absolut höchsten Konzentrationen gemessen, bei den anderen Versuchen, wo die Konzentrationen zwischen 4 und 18 pg/g Gewebe lagen, lagen die in 2 g Gewebe gemessenen Hormonkonzentrationen nicht zweimal sondern drei- bis viermal höher, als die in 1 g Gewebe gemessenen Mengen. Das Ergebnis kann jedoch noch als gut bewertet werden, zumal berücksichtigt werden muß, daß sich für die sehr niedrig liegenden Meßwerte hohe Standardabweichungen ergaben.

3.2.1.3.4. Bestimmung von Östradiol-17 β im Muskelgewebe im Rahmen einer Qualitätsprüfung

Zur weiteren Kontrolle wurde Muskelgewebe eines Kalbes untersucht, in dem nach Untersuchungen von Behr (1973) 5,5 ng Östradiol-17 β /g enthalten waren. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden im gleichen Gewebe ein Jahr später in 9 Untersuchungen durchschnittlich 6,0 ng Östradiol-17 β /g gemessen, was eine Bestätigung der von Behr (1973) erstellten Daten bedeutet.

3.2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der Überprüfung der Zuverlässigkeitskriterien

In diesem Kapitel wird mit Tabelle 39 der Versuch unter-
nommen, die in den Kapiteln 3.2.1.1. - 3.2.1.3.2. erstell-
ten Daten über die Zuverlässigkeit der Methoden und die
daraus resultierenden Beurteilungen nochmals schematisch
zusammenzufassen, wobei ein "subjektiver" Maßstab mit
5 Beurteilungsstufen erstellt wurde.

Tab. 39 Graduierung der Zuverlässigkeitskriterien

Hormon	Gewebe	Spezifi- tät	Genauig- keit	Repro- duzier- barkeit	untere Grenze der Empfind- lichkeit
Östron	Muskel	++++	++++	++ - +++	
	Leber	+++	+	+ - ++	0,033 ng
	Niere	++	+++	0 - ++	
	Fett	+++	++++	++	
Östradiol- -17 β	Muskel	++++	++++	+++	
	Leber	++	+++	+ - ++	0,030 ng
	Niere	+++	++++	++	
	Fett	++++	++++	+++	
Progesteron	Muskel	++	++	+++	
	Leber	0	0	++	0,040 ng
	Niere	+	0	+	

++++ = sehr gut; +++ = gut; ++ = befriedigend; + = ausreichend;
0 = nicht mehr ausreichend

Bei der Betrachtung der Tabelle wird ersichtlich, daß die Spezifität bei der Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β als durchaus gut bezeichnet werden muß. Ebenso kann die Genauigkeit - einzige Ausnahme ist die Östronbestimmung in der Leber - bei der Östrogenbestimmung insgesamt als gut bis sehr gut eingestuft werden; lediglich bei der Reproduzierbarkeit treten noch gewisse Mängel auf, die sich jedoch von Gewebe zu Gewebe unterscheiden (die Graduierung reicht von 0 - +++). Auf die Zusammenhänge zwischen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit wird in der Diskussion (Kapitel 5.1.) noch ausführlich eingegangen. Bei der Bestimmung von Progesteron kann lediglich für Muskelgewebe von einer akzeptablen Methodik gesprochen werden, die als gut bis befriedigend eingestuft werden kann. Dagegen zeigt sich für Leber- und Nierengewebe der etwas paradoxe Fall, daß bei mangelnder Spezifität und Genauigkeit reproduzierbare Meßwerte erzielt werden. Mit Werten zwischen 30 und 40 pg für die untere Grenze der Empfindlichkeit ergibt sich für dieses Zuverlässigkeitskriterium insgesamt ein gutes Ergebnis.

3.3. Versuche zur Weiterentwicklung der beschriebenen Methoden

Versuche dazu wurden durchgeführt unter Berücksichtigung der Gesichtspunkte, daß größere Mengen an Ausgangsmaterial ebenso wie homogeneres Untersuchungsmaterial verwendet werden sollten, unter Beibehaltung des Vorteiles der guten Praktikabilität. Dies erscheint möglich, indem die tatsächliche Menge an Ausgangsgewebe erhöht wird, ohne gleichzeitig die Masse zu erhöhen, z.B. nach Entfernung des Wasseranteils des Gewebes durch einen schonenden Trocknungsprozeß. Nach einer solchen Trocknung ist es jedoch unbedingt notwendig, das Gewebe gleich mit organischem Lösungsmittel zu versetzen, um ein erneutes Aufquellen zu vermeiden. In einem ersten Versuch wurde Muskelgewebe gewolft, in eine Petrischale eingewogen und mit der doppelten Menge an 80 %-igem Methanol versetzt und gut durchgemischt. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei 40° C in einem Vacuumofen (Modifikation nach Karg et al. 1972), die Ausbeute lag bei 30 % Trockenmasse. Die Trockenmasse wurde in einem Mörser nochmals zerkleinert und je 0,3; 0,6 und 0,9 g Trockenmasse wurde eingewogen und in einem Parallelansatz mit Chloroform und Äther extrahiert. Dazu wurden die Proben mit 4 ml Chloroform bei 50° C 2 Stunden im Wasserbad geschüttelt und danach

über Glaswollefilter in weitere Scintillationsgläser abgegossen, bzw. mit 10 ml Äther 20 Minuten auf dem in Kapitel 3.4. beschriebenen eindimensionalen Schüttler geschüttelt, abzentrifugiert und der Ätherextrakt vom gut abgesetzten Bodensatz abgekippt. Eine weitere entsprechende Extraktion mit 5 ml Äther folgte. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte, wie in Kapitel 3.1.2.4.1. (Östrogenbestimmung) bzw. in Kapitel 3.1.2.5. (Progesteronbestimmung) beschrieben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 40 und 41 aufzeigt.

Tab. 40 Vergleichende Bestimmungen von Östron und Östradiol-17 β in unterschiedlichen Mengen an Gewebstrockenmasse

		ng/Östrogen/Trockenmasse						
Extrak- tions- mittel	Para- meter	Östron			Östradiol-17 β			
		0,3 g	0,6g	0,9 g	0,3 g	0,6 g	0,9 g	
Chloroform	n	3	3	2	3	2	2	
	$\bar{x}$	0,030	0,040	0,096	0,082	0,208	0,270	
	S	0,046	0,017		0,012	0,088		
Äther	n	3	3	3	3	3	3	
	$\bar{x}$	0,033	0,087	0,111	0,035	0,072	0,114	
	S	0,014	0,120	0,010	0,041	0,031	0,000	

Die Wiederfindung des radioaktiven internen Standards lag bei der Extraktion mit Chloroform für Östron bei 56,5 % und für Östradiol-17 β bei 50,4 %.

Bei der Extraktion mit Äther lagen die entsprechenden Werte für Östron und Östradiol-17 β bei 56,8 % bzw. 44,4 %.

Sowohl bei der Extraktion mit Chloroform als auch bei der Extraktion mit Äther ergibt sich, wie aus den beiden Tabellen zu ersehen ist, mit zunehmender Gewebsmenge ein mehr oder weniger linearer Anstieg der Meßwerte. Bei der Extraktion von Östron wurden mit beiden Extraktionsmitteln etwa die gleichen Werte gemessen. Dagegen ergaben sich bei der Messung von Östradiol-17 β nach Extraktion durch Chloroform höhere Meßwerte im Vergleich zur Ätherextraktion.

In der Tabelle 41 werden die Ergebnisse der Progesteronbestimmung nach Extraktion mit Chloroform wiedergegeben.

Tab. 41 Bestimmung von Progesteron in unterschiedlichen Mengen an Gewebstrockenmasse nach Extraktion mit Chloroform

Parameter	ng Progesteron/Trockenmasse		
	0,3 g	0,6 g	0,9 g
n	3	3	3
$\bar{x}$	0,990	2,113	2,153
s	0,190	0,462	0,428

In diesem Versuch lag die Wiederfindung des radioaktiven internen Standards bei 42,0 %. Wie die Tabelle 41 zeigt, ergibt sich in diesem Versuch bei Extraktion von 0,6 g ein etwas mehr als doppelt so hoher Meßwert wie bei Extraktion von 0,3 g; dagegen ist dieser fast lineare Anstieg bei Extraktion zu 0,9 g Gewebstrockenmasse nicht mehr festzustellen. Daraus kann geschlossen werden, daß wahrscheinlich noch Störsubstanzen vorhanden sind. In einem weiteren Versuch wurde Muskelgewebe mit dem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert und dann lyophilisiert. Nach Einwaage von 0,3; 0,6 und 0,9 g Trockenmasse wurde, wie oben beschrieben, mit Chloroform extrahiert und, wie in Kapitel 3.1.2.4.1. bzw. 3.1.2.5.1. dargelegt, die Extraktion weitergeführt. Chloroform wurde als Extraktionsmittel ausgewählt, weil im vorhergehenden Versuch eine höhere Ausbeute an immunoreaktiven Substanzen erzielt worden war, als mit Äther. Die Ergebnisse sind aus der nächsten Tabelle Nr. 42 ersichtlich.

Tab. 42 Vergleichende Bestimmungen von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron in unterschiedlichen Mengen von lyophilisiertem Gewebe

Hormon	Parameter	0,3 g	0,6 g	0,9 g
Östron	n	3	3	3
	$\bar{x}$	0,356	0,790	1,055
	S	0,029	0,040	0,031

Hormon	Parameter	0,3 g	0,6 g	0,9 g
Östradiol-17 β	n	3	3	3
	$\bar{x}$	2,199	3,345	3,720
	S	0,237	0,209	0,357
Progesteron	n	3	3	3
	$\bar{x}$	2,370	4,503	4,250
	S	0,516	0,767	0,956

Die Wiederfindung des radioaktiven internen Standards lag in diesen Tests für Östron bei 50,3 %, für Östradiol-17 β bei 49,9 % und für Progesteron bei 33,0 %.

Wie die Tabelle 42 zeigt, war ein linearer Anstieg der gemessenen Östronmenge mit Erhöhung der Gewebsmasse deutlich, wobei die Standardabweichungen sehr gering waren. Für die Bestimmung für Östradiol-17 β und Progesteron kann dies jedoch nicht gesagt werden.

Insgesamt haben die Ergebnisse der in diesem Kapitel dargelegten Versuche die Annahme bestätigt, daß durch Verwendung von Gewebstrockenmasse das Problem der Meßwertgröße gelöst werden könnte. Diese Modifikationen müßten vor einer weiteren Anwendung jedoch noch auf die im Kapitel 3.2. beschriebenen Zuverlässigkeitskriterien überprüft werden.

3.4. Angewandte statistische Verfahren

Die Berechnung der in der Arbeit verwendeten statistischen Parameter erfolgte mit vorgegebenen Programmen an einem OLIVETTI Tischcomputer "programma 101" und an einem Wang Rechner "700 C" der Firma Wang Laboratories, Frankfurt.

3.5. Verwendete Reagentien und Materialien

Lösungsmittel:

Äther pro narcosi (Firma Hoechst), die Flaschen wurden frisch geöffnet und höchstens einen Tag lang verwendet. Tetrachlorkohlenstoff p.a. (Riedel de Haen, Nr. 32215) wurde, wie vom Hersteller geliefert, eingesetzt, ebenso Dioxan. Alle übrigen Lösungsmittel (Methanol, Chloroform, Benzol, Petroläther) wurden in p.a. Qualität bezogen und vor Gebrauch destilliert.

Reagentien:

1 N Natronlauge (Merck Nr. 9137), sowie 1 N Salzsäure (Merck Nr. 9057) waren auf den Faktor 1 eingestellt. Phosphatpuffer, pH 7,2, setzte sich zusammen aus 2,686 g Kaliumdihydrogenphosphat, 8,336 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,325 g Natriumazid, die in 1 Liter Aqua bidest gelöst waren.

Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin:

Zu 1 Liter des oben angeführten Phosphatpuffers wurden 1 g Rinderserumalbumin gegeben und in Lösung gebracht.

Als Material für die Säulenchromatographie wurde Sephadex LH 20 (Pharmacia, Fine Chemicals) verwendet.

Die im Radioimmunotest verwendete Kohlensuspension setzte sich zusammen aus: 2,0 g Holzkohle (Norit A, Partikelgröße 40 - 70 u) suspendiert in 1 Liter Aquabidest, in dem bereits 0,2 g Dextran (MG = 60.000 - 90.000) gelöst waren (Firma Serva).

Scintillationschemikalien und Zubehör:

PPO (2,5-Diphenyloxazole) und POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol) sowie Einweg-Niederdruck-Polyäthylenzählküvetten, Glaszählküvetten und die dazugehörigen Einwegschraubverschlüsse mit Kork-Zinnfolieneinlage wurden von der Firma Zinser (Frankfurt) bezogen; Naphtalin für Fabrikationszwecke wurde, wie vom Hersteller geliefert, verwendet. Die Scintillationsflüssigkeit (Bray's Solution) setzte sich, wie bei Neill et al. (1967) angegeben, aus 500 g Naphtalin, 35 g PPO und 1,5 g POPOP, gelöst in 5 Liter Dioxan, zusammen.

Verwendete Steroidsubstanzen:

Die nicht radioaktiv markierten Östrogene wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; System

Benzol : Methanol = 9 : 1) ebenso wie das nicht markierte Progesteron (Kieselgel; System Äther : Benzol = 2 : 1) sowie auch durch Schmelzpunktbestimmung auf ihre Reinheit und Identität hin überprüft.

Die mit Tritium markierten Östrogene, Östron (Östron-2,4,6,7 ^3H (n), 100 Ci/mmol) und Östradiol-17 β (Östradiol-17 β -2,4,6,7 ^3H (n), 85 Ci/mmol), Tritium markiertes Progesteron (Progesteron-1,2,6,7 ^3H , spezifische Aktivität 110 Ci/mmol) wurde vom Radiochemical Centre Amersham, bezogen. Die Identität und radiochemische Reinheit wurde durch Vergleichs- und Mischchromatogramme mit den entsprechenden nicht markierten Östrogenen und mit Progesteron in den oben angegebenen Laufmittelsystemen überprüft.

Besondere Glaswaren und Geräte:

Einweggläser für den Radioimmunotest (AR-Glas 74 x 14 mm) wurden von der Firma Kremer und Kreiler, München, bezogen.

Der verwendete Homogenisator, ein Ultra-Turrax-Gerät (TP 18/2N), stammte von der Firma Janke und Kunkel (Staufen). Die Zugabe des Antiserums im Radioimmunotest erfolgte mit einer Revolverspritze Modell "Muto" (Firma Hauptner); für die Zugabe der Kohlensuspension stand eine automatische Selbstfüllerspritze Modell "Ultra Asept" (Firma Henke, Tuttlingen) mit einem Füllvolumen von 2 ml zur Verfügung.

Der Schüttelautomat der Firma Bühler (Tübingen), Typ Sm 2, hatte ein Fassungsvermögen von 120 Proben; die dazu passenden, in der Institutswerkstätte hergestellten Einsätze aus Aluminium mit Plastikhalterung für die Gläser, faßten je 40 Gläser.

Der Vacuumentrockenschrank der Firma W.C. Heraeus (Hanau), Typ RVT 500, hatte eine Temperatureinstellung von 0 - 180° C und ein Fassungsvermögen über 200 Proben.

4. E r g e b n i s s e d e r R ü c k s t a n d s u n t e r - s u c h u n g e n

4.1. Angaben zu dem Modellversuch mit elf männlichen Kälbern

4.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung

Im Rahmen eines von mehreren Instituten gemeinsam durchgeführten Pilotversuches⁺ standen für vorliegende Untersuchungen elf männliche deutsche Braunviehkälber zur Untersuchung zur Verfügung. Die Kälber wurden im

+

Außer unserem Institut waren noch folgende Institutionen an der Durchführung des Pilotversuches beteiligt:

- 1) Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.
- 2) Bayerische Landesanstalt für Tierzucht - Grub
- 3) Bayerische Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung -
Oberschleißheim
- 4) Institut für Ernährungsphysiologie der Tier-
ärztlichen Fakultät der Universität München
- 5) Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tier-
ärztlichen Fakultät der Universität München

Alter von ca. 1 Woche eingestellt. Nach ca. 4 Wochen zeigte sich bei allen Tieren ein starker Husten, der sich jedoch im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführung wieder legte.

Während der Versuchszeit erhielten die Tiere bis zum Lebendgewicht von etwa 100 kg einen Vollmilch-austauscher als Alleinfutter, der nach Angaben des Herstellers (Friedrich Botzenhardt KG, Kraftfutterwerk Kempten) folgendermaßen zusammengesetzt war:

67 % Magermilchpulver; 19 % Fettmischung für Kälber; 4 % teilverzuckerte Maisquellstärke; 7 % Sprühsüßmolkepulver; 1,95 % Mineralstoffmischung für Kälber; 0,70 % Sojafinmehl; 0,30 % Antibiotikavormischung (Reg. Nr. FM 54/72) gebunden an extrahierte Soja-schrot und 0,05 % Vitaminvormischung für Kälber.

Ab 100 kg Lebendgewicht erhielten die Kälber ausschließlich den Milchaustauscher Maststufe II (Friedrich Botzenhardt KG, Kraftfutterwerk Kempten), das nach Angaben des Herstellers folgendermaßen zusammengesetzt war:

36 % Magermilchpulver; 19 % Fettmischung für Kälber; 6,60 % teilverzuckerte Maisquellstärke; 35 % Süßmolkepulver; 0,20 % Mineralstoffmischung für Kälber; 0,05 % Vitaminvormischung für Kälber und 2,05 % Weizenflocken.

4.1.2. Durchführung der Hormonbehandlung

Nach einer Anpassungsphase von 20 Tagen schloß sich der Versuch an, der 72 Tage dauerte.

5 Kälber erhielten am Ohrgrund ein Placebo implantiert. 6 weitere Kälber erhielten das Präparat V-Implix^R M in Form von 10 Preßlingen, die als Gesamtdosis 20 mg Östradiol-17 β und 200 mg Progesteron enthielten, subcutan am Ohrgrund implantiert.

4.1.3. Probengewinnung

Die Kälber wurden 72 Tage nach der Behandlung geschlachtet. Die Probenentnahme erfolgte nach einer kurzen, für jedes Kalb unterschiedlichen Kühlzeit. Das Muskelgewebe stammte aus der Muskulatur der langen Zehenbeuger, als Leberprobe wurde der Spiegelsche Lappen herangezogen und außerdem wurden von jedem Kalb eine Niere und das Nierenfett (Flomen) entnommen.

Die entnommenen Gewebeteile wurden in Plastiktüten verbracht, zunächst auf Eis gelagert und dann bis zur Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.1.2.) in Tiefkühlschränken bzw. in einer Tiefgefrierzelle bei -18° C gelagert.

4.2. Ergebnisse der Östrogenbestimmung

Um die Übersicht zu wahren, sind die Ergebnisse der Einzelbestimmungen unter Angabe der Parameter n (Anzahl der Einzelbestimmungen bzw. der untersuchten Kälber), $\bar{x}$ (Durchschnittswert) und S (Streuung) wiederum in Form von Tabellen zusammenfassend dargestellt.

4.2.1. Muskelgewebe

Die Ergebnisse von 81 Einzeluntersuchungen im Muskelgewebe sind in der Tabelle 43 zusammengefaßt.

Tab. 43 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Muskelgewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Hormon	Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S
Östron	1	2	0,110		6	4	0,085	0,064
	2	4	0,055	0,037	7	8	0,098	0,085
	3	4	0,062	0,051	8	3	0,020	0,020
	4	4	0,030	0,060	9	3	0,043	0,045
	5	4	0,120	0,078	10	4	0,205	0,156
Östradiol- -17 β	1	2	0,350		6	4	0,227	0,239
	2	4	0,115	0,136	7	6	0,005	0,008
	3	2	u.M. ⁺⁺		8	3	0,066	0,115
	4	2	u.M.		9	3	0,399	0,331
	5	3	0,100	0,173	10	4	0,085	0,101
					11	4	0,291	0,224

⁺ n = Anzahl der Einzeluntersuchungen

⁺⁺ u.M. = unter der Meßgrenze

Bei den Kontrollkälbern lagen die erfaßten Östronwerte zwischen 0,030 ng/g und 0,120 ng/g Gewebe und die erfaßten Östradiol-17 β Werte zwischen Konzentrationen unterhalb des Meßbereiches und 0,350 ng/g Muskelgewebe. Bei den behandelten Kälbern lag der Schwankungsbereich

für Östron bei 0,020 ng/g bis 0,205 ng/g und für Östradiol-17 β bei 0,005 ng/g bis 0,291 ng/g Gewebe.

Faßt man die durchschnittlichen Östronwerte aller Kontrollkälber zusammen, so kommt man auf einen Mittelwert von 0,075 ($\pm$ 0,038) ng/g Muskelgewebe. Bei den 6 behandelten Tieren liegt der Mittelwert, errechnet aus den in Tabelle 43 angegebenen Durchschnittswerten, bei 0,084 ($\pm$ 0,065) ng/g Muskelgewebe. Die mittleren Östradiol-17 β Ergebnisse für Muskelgewebe zusammengefaßt ergeben 0,113 ($\pm$ 0,143) ng/g bei den Kontrollkälbern und 0,177 ($\pm$ 0,149) ng/g bei den behandelten Tieren. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 44 noch einmal aufgezeigt.

Tab. 44 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Muskelgewebe
unbehandelter und behandelter Kälber
(Zusammenfassung der Durchschnittswerte)

Hormon	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	n ⁺	$\bar{x}$	s	n ⁺	$\bar{x}$	s
Östron	5	0,075	0,038	6	0,084	0,065
Östradiol-17 β	5	0,113	0,143	6	0,177	0,149

n⁺ = Anzahl der untersuchten Kälber

Die Zusammenfassung zeigt, daß die Durchschnittswerte bei den Kontrolltieren und den behandelten Tieren für Östron in Muskelgewebe fast identisch sind. Eine etwas größere Differenz ergibt sich für die Östradiol-17 β Werte, die jedoch auf Grund der starken Streuungen nicht gesichert sind ($p > 0,70$). Wie ebenfalls aus der Tabelle zu ersehen ist, liegen bei den beiden Gruppen die Mittelwerte für Östradiol-17 β geringgradig höher als die für Östron.

4.2.2. Lebergewebe

Bei insgesamt 141 Einzeluntersuchungen im Lebergewebe wurden die in Tabelle 45 angegebenen Mittelwerte für Östron und Östradiol-17 β für die einzelnen Tiere errechnet.

Tab. 45 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Lebergewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Hormon	Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	s	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	s
Östron	1	4	0,087	0,103	6	4	0,014	0,016
	2	6	0,267	0,094	7	5	0,335	0,126
	3	7	0,174	0,152	8	5	0,263	0,176
	4	7	0,181	0,098	9	6	0,266	0,059
	5	14	0,315	0,244	10	8	0,296	0,107
					11	7	0,455	0,249
Östradiol- -17 β	1	4	u.M. ⁺⁺		6	4	0,017	0,023
	2	6	0,005	0,010	7	5	0,178	0,142
	3	6	0,037	0,024	8	5	0,047	0,065
	4	6	0,010	0,009	9	5	0,198	0,281
	5	12	0,316	0,324	10	8	0,094	0,067
					11	7	0,114	0,042

+ = Anzahl der Einzeluntersuchungen

++ = unter der Meßgrenze

Die Werte für Östron im Lebergewebe der unbehandelten Tiere schwankten von 0,087 ng/g bis zu 0,315 ng/g, die der behandelten Tiere schwankten von 0,014 ng/g bis zu 0,455 ng/g. Bei der Messung von Östradiol-17 β lag bei

den unbehandelten Tieren der niedrigste Wert unterhalb der Meßgrenze, der höchste Wert bei 0,316 ng/g Lebergewebe; bei den behandelten Kälbern betrug der niedrigste Durchschnittswert 0,017 ng/g und der höchste 0,198 ng/g Lebergewebe.

Faßt man alle Durchschnittswerte für Östron in der Leber bei den Kontroll- bzw. Behandlungskälbern zusammen, so kommt man auf einen Mittelwert von 0,204 ng/g (Kontrolle) bzw. 0,271 ng/g Lebergewebe (Behandlungsgruppe).

Entsprechend liegen die errechneten Werte für Östradiol-17 β bei 0,073 ng/g Gewebe bei den Kontrolltieren und bei 0,108 ng/g Gewebe bei den behandelten Kälbern.

Das zusammenfassende Ergebnis ist in Tabelle 46 aufgezeigt.

Tab. 46 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Lebergewebe
unbehandelter und behandelter Kälber
(Zusammenfassung der Durchschnittswerte)

Hormon	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	n ⁺	$\bar{x}$	s	n ⁺	$\bar{x}$	s
Östron	5	0,204	0,088	6	0,271	0,144
Östradiol-17 β	5	0,073	0,136	6	0,108	0,071

n⁺ = Anzahl der untersuchten Kälber

Auch hier wurden bei den behandelten Tieren geringgradig höhere Durchschnittswerte gefunden. Auf Grund der starken Streuung kann aber nicht von einem Unterschied gesprochen werden ($p > 0,40$ für Östron und $p > 0,60$ für Östradiol-17 β). Wie weiterhin aus der Tabelle zu ersehen ist, liegen hier, im Gegensatz zur Untersuchung im Muskelgewebe (siehe Tabelle 44), die Werte für Östron mehr als doppelt so hoch wie die für Östradiol-17 β .

4.2.3. Nierengewebe

Das Ergebnis der Einzeluntersuchungen ist für jedes Kalb extra in der Tabelle 47 zusammengefaßt.

Tab. 47 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Nierengewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Hormon	Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S
Östron	1	2	0,060		6	4	0,226	0,192
	2	2	u.M. ⁺⁺		7	4	0,065	0,071
	3	4	0,016	0,017	8	2	0,010	
	4	4	0,064	0,078	9	2	0,035	
	5	2	0,095		10	2	0,062	
					11	2	0,090	
Östradiol- -17 β	1	2	u.M.		6	3	u.M.	
	2	2	u.M.		7	2	0,055	
	3	2	u.M.		8	2	0,020	
	4	4	0,015	0,019	9	2	0,070	
	5	2	0,020		10	4	0,032	0,021
					11	2	u.M.	

⁺ = Anzahl der Untersuchungen

⁺⁺ = unter der Meßgrenze

Im Vergleich zur Messung von Östron und Östradiol-17 β in Muskel-, Leber- und auch Fettgewebe (siehe Tabellen 44, 46 und 50) sind im Nierengewebe insgesamt die niedrigsten Werte gemessen worden.

So lagen die Östronkonzentrationen bei den Kontrolltieren zwischen Werten unterhalb der Meßgrenze und 0,094 ng/g, bei den behandelten Tieren lagen sie zwischen 0,010 ng/g und 0,090 ng/g bzw. 0,226 ng/g; entsprechend lagen die Östradiol-Werte zwischen Werten unterhalb der Meßgrenze und 0,020 ng/g bei den Kontrolltieren bzw. 0,070 ng/g bei den behandelten Tieren. Das zusammenfassende Ergebnis ist, getrennt nach Hormon- und Behandlungsgruppe, in der Tabelle 48 dargestellt.

Tab. 48 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Nierengewebe
unbehandelter und behandelter Kälber
(Zusammenfassung aller Durchschnittswerte)

Hormon	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	n ⁺	$\bar{x}$	S	n ⁺	$\bar{x}$	S
Östron	5	0,047	0,038	6	0,081	0,076
Östradiol-17 β	5	0,011	0,010	6	0,029	0,028

n⁺ = Anzahl der Kälber

Obwohl der Östronwert für die Behandlungsgruppe mit 0,081 ng/g fast doppelt so hoch ist, wie für die Kontrollgruppe (0,047 ng/g), ist er mit $p > 0,40$ nicht signifikant unterschiedlich, da er auf den

hohen Wert, der beim Kalb Nr. 6 aufgetreten ist,
(0,226 ng/g), zurückzuführen ist.

Auch für Östradiol-17 β ist die Differenz zwischen den
unbehandelten und den behandelten Kälbern auf Grund
der starken Streuungen mit $p > 0,20$ nicht gesichert.

4.2.4. Fettgewebe

Wie aus Tabelle 49 hervorgeht, in der die Ergebnisse
der Einzeluntersuchungen zusammengefaßt sind,

Tab. 49 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Fettgewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Hormon	Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S
Östron	1	6	0,295	0,332	6	8	0,081	0,111
	2	5	0,129	0,121	7	3	0,513	0,031
	3	5	0,303	0,191	8	8	0,106	0,058
	4	7	0,347	0,189	9	4	0,432	0,082
	5	5	0,303	0,051	10	9	0,120	0,124
					11	7	0,262	0,100
Östradiol- -17 β	1	5	0,209	0,257	6	3	0,052	0,020
	2	6	0,167	0,183	7	5	0,023	0,028
	3	4	0,070	0,062	8	3	0,048	0,010
	4	4	0,108	0,050	9	4	0,079	0,027
	5	5	0,093	0,045	10	5	0,182	0,174
					11	4	0,243	0,140

⁺ = Anzahl der Einzeluntersuchungen

lagen bei den Kontrollkälbern die ermittelten durchschnittlichen Östronwerte zwischen 0,129 ng/g und 0,347 ng/g bzw. zwischen 0,070 ng/g und 0,209 ng/g Gewebe bei Östradiol-17 β .

Bei den behandelten Kälbern lagen die entsprechenden Werte zwischen 0,081 ng/g und 0,513 ng/g für Östron und zwischen 0,023 ng/g und 0,243 ng/g Fettgewebe für Östradiol-17 β .

Faßt man die durchschnittlichen Östronwerte aller Kontroll- und Behandlungskälber zusammen, so kommt man, wie Tabelle 50 zeigt, auf Mittelwerte von 0,275 ng/g bzw. 0,252 ng/g Fettgewebe. Die entsprechenden Durchschnittswerte für Östradiol-17 β ergeben zusammengefaßt 0,129 ng/g für die Kontrolltiere bzw. 0,104 ng/g für die behandelten Tiere.

Tab. 50 Östron und Östradiol-17 β in ng/g Fettgewebe
unbehandelter und behandelter Kälber
(Zusammenfassung aller Ergebnisse)

Hormon	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	n ⁺	$\bar{x}$	S	n ⁺	$\bar{x}$	S
Östron	5	0,275	0,084	6	0,252	0,183
Östradiol-17 β	5	0,129	0,057	6	0,104	0,087

+
= Anzahl der untersuchten Kälber

Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe zeigten sich nicht. Bei diesen Untersuchungen lag sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der Behandlungsgruppe der durchschnittliche Östronwert mehr als doppelt so hoch wie der durchschnittliche Östradiolwert.

4.3. Ergebnisse der Progesteronbestimmung

Um auch hier die Übersicht zu wahren, sind, entsprechend wie bei der Östrogenbestimmung, im Textteil die Ergebnisse der Progesteronbestimmung unter Angabe der Parameter (n) , $(\bar{x})$ und (S) in Form von Tabellen zusammenfassend dargestellt.

Die Ergebnisse der Progesteronbestimmung müssen unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.2. dargestellten Zuverlässigkeitskriterien gesehen werden.

4.3.1. Muskelgewebe

Die in 32 Einzeluntersuchungen im Muskelgewebe gefundenen Ergebnisse sind in der Tabelle 51 dargestellt.

Tab. 51 Progesteron in ng/g Muskelgewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S
1	4	0,242	0,115	6	4	0,335	0,084
2	2	0,400		7	2	0,510	
3	6	0,190	0,133	8	2	1,215	
4	2	0,195		9	2	0,530	
5	4	0,210	0,036	10	2	0,295	
				11	2	0,210	

+ = Anzahl der Einzeluntersuchungen

Wie aus der Tabelle 51 hervorgeht, lagen bei den Kontrollkälbern die erfaßten Progesteronwerte zwischen 0,190 ng/g und 0,400 ng/g Muskelgewebe und - geringgradig höher - bei den behandelten Kälbern zwischen 0,210 ng/g und 1,215 ng/g Gewebe. Insgesamt ergab sich zwischen den beiden Tiergruppen kein gesicherter Unterschied (siehe Tabelle 54).

4.3.2. Lebergewebe

Die Ergebnisse der insgesamt 59 Einzeluntersuchungen auf Progesteron im Lebergewebe sind in der Tabelle 52 für jedes Kalb getrennt zusammengefaßt.

Tab. 52 Progesteron in ng/g Lebergewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	S
1	4	0,111	0,020	6	4	0,364	0,041
2	5	0,295	0,412	7	6	0,336	0,146
3	6	0,412	0,241	8	6	0,393	0,202
4	5	0,302	0,083	9	5	0,343	0,147
5	2	0,225		10	10	0,235	0,040
				11	6	0,280	0,163

n⁺ = Anzahl der Einzeluntersuchungen

Ähnlich wie im Muskelgewebe liegen auch hier die Meßwerte zwischen 0,111 ng/g und 0,412 ng/g Gewebe bei der Kontrollgruppe und bei 0,235 ng/g bis 0,393 ng/g bei der behandelten Gruppe. Die Zusammenfassung der Durchschnittswerte ist wieder in Tabelle 54 dargestellt.

4.3.3. Nierengewebe

Das Ergebnis der Einzeluntersuchungen ist in
Tabelle 53 zusammengefaßt.

Tab. 53 Progesteron in ng/g Nierengewebe
unbehandelter und behandelter Kälber

Kontrollgruppe				Behandlungsgruppe			
Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	s	Kalb Nr.	n ⁺	$\bar{x}$	s
1	4	0,235	0,064	6	4	0,656	0,153
2	2	0,730		7	2	0,840	
3	2	0,625		8	2	0,380	
4	2	0,310		9	2	0,615	
5	2	0,380		10	2	0,535	
				11	2	0,690	

⁺ = Anzahl der Einzeluntersuchungen

Bei gleicher Größenordnung herrscht im Nierengewebe die Tendenz zu höheren Werten im Vergleich zu Muskel- oder Lebergewebe. Die Werte für Progesteron im Nierengewebe der unbehandelten Tiere schwankten von 0,235 ng/g bis zu 0,625 ng/g, die der behandelten Tiere reichten von 0,380 ng/g bis zu 0,840 ng/g Nierengewebe.

Die Zusammenfassung aller Durchschnittswerte (unbehandelter und behandelter Kälber) ist in der Tabelle 54 wiedergegeben.

Tab. 54 Progesteron-Durchschnittswerte in ng/g Muskel-, Leber- und Nierengewebe unbehandelter und behandelter Kälber
(Zusammenfassung aller Ergebnisse)

Gewebe	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	n^+	$\bar{x}$	s	n^+	$\bar{x}$	s
Muskel	5	0,247	0,087	6	0,515	0,364
Leber	5	0,269	0,110	6	0,325	0,057
Niere	5	0,456	0,211	6	0,619	0,154

n^+ = Anzahl der untersuchten Kälber

Aus der Tabelle 54 wird ersichtlich, daß die ermittelten Werte bei den behandelten Tieren in allen untersuchten Geweben geringgradig höher liegen, als bei den unbehandelten Kälbern. Auf Grund der hohen Streuung, sind die Unterschiede - mit $p > 0,20$ für Muskelgewebe; $p > 0,30$ für Lebergewebe und $p > 0,20$ für Nierengewebe - als nicht gesichert anzusehen.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel sollen zur besseren Übersicht für die Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron in den einzelnen Geweben die Ergebnisse an Hand einer Tabelle noch einmal zusammenfassend dargestellt werden. Angegeben sind jeweils die einzelnen Durchschnittswerte und deren Streuung.

Tab. 55 Zusammenfassung aller Ergebnisse der Östron-, Östradiol-17 β - und von Progesteron in verschiedenen Geweben unbehandelter und behandelter Kälber

Hormon	Gewebe	Kontrollgruppe		Behandlungsgruppe	
		$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S
Östron ng/g	Muskel	0,075	0,038	0,084	0,065
	Leber	0,204	0,088	0,271	0,144
	Niere	0,047	0,038	0,081	0,076
	Fett	0,275	0,084	0,252	0,183
Östradiol- -17 β ng/g	Muskel	0,113	0,143	0,177	0,149
	Leber	0,073	0,136	0,108	0,071
	Niere	0,011	0,010	0,029	0,028
	Fett	0,129	0,057	0,104	0,087
Pro- gesteron ng/g	Muskel	0,247	0,087	0,515	0,364
	Leber	0,269	0,110	0,325	0,057
	Niere	0,456	0,211	0,619	0,154

Bei einem Vergleich der in der Tabelle 55 angegebenen Daten für die Kontroll- und Behandlungsgruppe wird deutlich, daß - trotz der Tendenz zu leicht höheren Werten bei den behandelten Tieren - keine gesicherten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden konnten. In jedem Fall lagen die gemessenen Durchschnittswerte für die Östrogene unter 0,3 ng/g Gewebe und für Progesteron unter 0,7 ng/g Gewebe sowohl bei den Kontrolltieren, als auch bei den behandelten Tieren.

Eine ausführliche Kommentierung der Ergebnisse ist in den jeweiligen Kapiteln 4.2. und 4.3. bzw. in der Diskussion der Ergebnisse (Kapitel 5.2.) wiedergegeben.

5. D i s k u s s i o n

5.1. Diskussion der Methodik

Ein erstes Ziel vorliegender Arbeit war es, radioimmunologische Verfahren, die praktikabel, empfindlich und zuverlässig sind, zur Bestimmung von Östron, Östradiol-17 β und Progesteron in verschiedenen Geweben vom Rind einzurichten. Für die Bestimmung dieser 3 Sexualhormone im Plasma standen im hiesigen Labor radioimmunologische Methoden zur Verfügung, worüber mehrfach berichtet worden war (Hoffmann 1971a und 1971b; Hoffmann, Karg 1971a; Hoffmann, Karg 1971b; Hoffmann 1972; Hoffmann et al. 1973). Auch über erste Erfahrungen über die radioimmunologische Östrogenbestimmung speziell im Muskelgewebe war berichtet worden (Hoffmann, Karg 1973; Behr 1973).

Der methodische Schwerpunkt vorliegender Arbeit lag darin - auf den vorliegenden Erfahrungen aufbauend - weitere Extraktionsgänge zu entwickeln, die es gestatten, in den Endextrakten eine zuverlässige radioimmunologische Messung durchzuführen.

Auf Grund der im Institut gemachten Erfahrungen (Hoffmann und Karg 1973; Behr 1973) wurden bei der Bestimmung der Östrogene von Anfang an die hochspezifischen

Antisera (siehe Kapitel 3.1.2.2.), sowie die Grundzüge des Aufarbeitungsganges (primäre Ätherextraktion, Gewinnung der phenolischen Fraktion, Auftrennung von Östron und Östradiol-17 β auf Sephadex LH 20 Säulen) beibehalten. Im Verlauf der Arbeiten konnte dieser Extraktionsgang durch verschiedene Maßnahmen erheblich praktikabler gestaltet werden, worauf in Kapitel 3.1.2.4. ausführlich eingegangen wurde. Hier sei nur nochmals erwähnt, daß durch Homogenisation in Glasscintillationsküvetten und nachfolgende Ätherextraktion in den gleichen Gläsern auf einem automatischen Schüttler die Probenkapazität erheblich gesteigert werden konnte. Danach konnte die organische Phase nach Einfrieren bei -18° C durch einfaches Abkippen von der wässrigen Phase getrennt werden. Dieser spezielle Schritt steigerte nicht nur die Praktikabilität des Verfahrens, sondern es zeigte sich auch, daß durch das Einfrieren Emulsionen gebrochen werden konnten und daß auch sehr wahrscheinlich Lipidanteile, die gewöhnlich als Störfaktoren beim Radioimmunotest in Erscheinung traten, durch diesen Ausfrierungsprozeß entfernt worden sind. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits gemachten Erfahrungen bei der Progesteronbestimmung in der Milch (Hoffmann und Hamburger 1973).

Bei der Entwicklung von Verfahren zur Bestimmung von Progesteron in Geweben wurde davon ausgegangen, daß Progesteron einmal im Zusammenhang mit den Östrogenen gemessen werden soll, daß aber auch vielfach Messungen zur alleinigen Bestimmung von Progesteron durchgeführt werden müssen (z.B. bei notwendigen Wiederholungsmessungen). Demzufolge wurde Progesteron einmal, nach Abtrennung der Östrogene mit der phenolischen Fraktion, in der verbleibenden neutralen Fraktion gemessen und einmal nach direkter Extraktion aus dem Gewebe mit Petroläther. Für den derzeitigen Stand der Analytik gilt, daß als effektivster Reinigungsschritt eine Lösungsmittelverteilung zwischen 80 %-igem Methanol und Petroläther angesehen werden muß. Eine zusätzliche durchgeführte säulenchromatographische Reinigung ergab hier, wie in Kapitel 3.1.2.5.1. aufgeführt ist, keinen weiteren spezifitätssteigernden Effekt.

In umfangreichen Untersuchungen wurde weiterhin versucht, die Zuverlässigkeit dieser Methoden zu überprüfen. Nachdem, wie in Kapitel 3.2.1. bereits dargelegt wurde, für die erfaßten niedrigen Meßbereiche keine genügend empfindlichen Referenzmethoden zur Verfügung standen, wurde versucht, auf indirektem Wege das wichtigste Zuverlässigkeitskriterium - die Spezifität - zu überprüfen.

Es wurde davon ausgegangen, daß im Gewebe vorhandenes endogenes Hormon und ein entsprechendes zugesetztes exogenes Hormon sich während des Extraktionsganges und der nachfolgenden radioimmunologischen Messung gleich verhalten. Fehler in der quantitativen Wiederfindung solcher Zusätze sind, da ein interner Standard zur Korrektur der Aufarbeitungsverluste verwendet wurde, in jedem Fall - wenn von gewissen naturgegebenen technischen Mängeln abgesehen wird - auf Beeinflussung der kinetischen Abläufe der Protein-Bindungs-Reaktion durch noch vorhandene Störsubstanzen zurückzuführen.

Die Wiederfindung solcher abgestufter Hormonzusätze kann also nicht nur als Maßstab für die Genauigkeit, sondern - bei Erfassung aller Werte und Berechnung des Regressionskoeffizienten - auch als Maßstab für die Spezifität herangezogen werden. Im Idealfall wäre ein Regressionskoeffizient von $b = 1$ zu erwarten. Fehlinterpretationen können sich nur dann ergeben, wenn - wie dies für die Progesteronbestimmung in der Niere der Fall war - bei mangelhafter Genauigkeit der wiedergefundenen Absolutwerte die Abstufung der Zusätze reproduziert wird. Obwohl hier die Beurteilung der Spezifität im wesentlichen auf den für die Genauigkeit erstellten Daten basiert, können sich doch

Unterschiede in der Beurteilung der beiden Parameter, wie aus Tabelle 39 hervorgeht, ergeben. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der Berechnung der Regressionskoeffizienten alle erhaltenen Einzelwerte, bei Wiederfindung der abgestuften Dosierungen in die Berechnung eingingen, während die Genauigkeit für jede Zusatzdosierung speziell berechnet wurde. Diese Untersuchungen zeigten, wie in Kapitel 3.2.2. schon ausgeführt wurde, daß die Spezifität bei der Bestimmung der Östrogene als durchaus gut bezeichnet werden muß, während sie bei der Bestimmung von Progesteron - mit Ausnahme im Muskelgewebe, wo sie als befriedigend gelten kann - als nicht ausreichend angesehen werden muß. Diese Beobachtung verdeutlicht, welche große Bedeutung dem Extraktionsgang beizumessen ist, da trotz des Einsatzes hochspezifischer Antikörper nur dann mit einem spezifischen Ergebnis zu rechnen ist, wenn durch einen entsprechenden Extraktionsgang die Bindungskinetik störende Faktoren entfernt worden sind.

Die durchschnittliche Wiederfindung jedes einzelnen Zusatzwertes ($\bar{x}$) wurde als Maßstab für die Genauigkeit herangezogen, während die beiden anderen mitberechneten Parameter, S und V_k , primär für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit herangezogen wurden. Eine exakte Abgrenzung der Kriterien Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ist jedoch auf Grund der angestellten Versuchs-

durchführung nicht möglich. So zeigte sich in vorliegenden Untersuchungen, daß - vorausgesetzt die Spezifität ist gesichert und die Reproduzierbarkeit als mindestens ausreichend eingestuft - die Genauigkeit eine direkte Funktion von n, d.h. der durchgeführten Wiederfindungsversuche, ist. Hier zeigen sich gewisse Parallelen zu biologischen Versuchsanstellungen, wo auch mit steigen der Versuchsgliederzahl die Genauigkeit verbessert werden kann.

Dieser Tatsache wurde in vorliegender Arbeit insofern Rechnung getragen, daß bei den meisten Östrogenbestimmungen in verschiedenen Geweben nicht nur Doppel- sondern Mehrfachbestimmungen durchgeführt worden sind. Bei der Bestimmung von Progesteron in Leber und Niere wird das erzielte Meßergebnis trotz akzeptabler Reproduzierbarkeit der Methode und einer relativ hohen Zahl an Einzelbestimmungen in seiner qualitativen und quantitativen Aussage beschränkt bleiben, da die Spezifität und damit die Genauigkeit als nicht mehr ausreichend eingestuft werden mußten. An dieser Stelle soll noch erwähnt werden, daß auch versucht wurde, Progesteron im Fettgewebe zu messen. Da die bisher erzielten Ergebnisse als nicht relevant bezeichnet werden müssen, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

Bei der Empfindlichkeit handelt es sich um eine echte Meßgröße, die sich aus dem durchschnittlichen Reagentien-leerwert und der durchschnittlichen Standardabweichung errechnet. Bei 30 - 40 pg als untere Meßgrenze muß die Empfindlichkeit als gut bezeichnet werden. Eine weitere Verbesserung dieses Zuverlässigkeitskriteriums ist auf Grund eigener Erfahrungen nach Durchführung vorliegender Arbeit nicht oder nur sehr schwer zu erreichen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Bei Anwendung der beschriebenen Verfahren, die in Kapitel 5.1. ausführlich diskutiert wurden, gelang es, Östron und Östradiol-17 β im Muskel-, Leber-, Nieren- und Fettgewebe routinemäßig zu messen, und damit für diese Hormone das zweite gesteckte Ziel vorliegender Arbeit zu erreichen. Dagegen wurde für Progesteron, das einigermaßen zuverlässig nur im Muskelgewebe gemessen werden konnte, die Zielsetzung nicht ganz erreicht, da die für Leber- und Nierengewebe erstellten Daten nur Anhaltspunkte geben können.

Zu den vorliegenden Ergebnissen der Östrogen- und Progesteronbestimmung ist zu sagen, daß sich zunächst

stets positive Meßwerte ergaben und daß diese abhängig waren nicht nur von dem zu untersuchenden Hormon, sondern auch vom Gewebe, in dem die Messung durchgeführt wurde und vom Kalb, von dem das Gewebe stammte. Dies galt für die Kontroll- und die Behandlungsgruppe. So war es durchaus möglich, daß der Einzelwert, der bei einem Kontrollkalb ermittelt wurde, höher lag als der Durchschnittswert aller Behandlungskälber. Im allgemeinen lagen - mit Ausnahme der Östrogenkonzentration im Fettgewebe - die Durchschnittswerte für die Behandlungskälber geringgradig höher als für die der Kontrollkälber. Trotz dieser sichtbar werdenden Tendenz ergab sich in keinem Fall ein nur annähernd gesicherter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Die gemessenen Konzentrationen lagen bei Berücksichtigung der Durchschnittswerte für die Östrogene unter 0,3 ng/g Gewebe und für Progesteron unter 0,7 ng/g Gewebe.

Außer den Ergebnissen in vorliegender Arbeit liegen bisher lediglich von Hoffmann und Karg (1973) sowie von Behr (1973) Angaben über die Östrogenuntersuchungen im Muskelgewebe mit Hilfe eines radioimmunologischen Meßverfahrens, allerdings nur bei einem behandelten und einem unbehandelten Kalb, vor.

Während Behr (1973) jedoch einen Wert von 5,5 ng Östradiol-17 β /g Muskelgewebe für das behandelte Kalb erstellte, liegen die in vorliegender Arbeit gemessenen Werte für Östradiol-17 β auch bei den behandelten Kälbern durchschnittlich unter 0,2 ng/g Muskelgewebe. Es handelt sich hier um einen echten Unterschied, da in noch zur Verfügung stehendem Muskelgewebe der von Behr (1973) aufgestellte Meßwert bestätigt werden konnte (Kapitel 3.2.1.3.4.). Es muß dabei jedoch berücksichtigt werden, daß das von Behr (1973) untersuchte Kalb, das mit 25 mg Östradiolbenzoat und 140 mg Trenbolonacetat behandelt worden war, bereits 36 Tage nach der Implantation geschlachtet wurde, während die in vorliegender Arbeit untersuchten Kälber 72 Tage nach der Implantation zur Schlachtung kamen. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß bei dem von Behr (1973) untersuchten Kalb die Implantation in den Triel erfolgte, während hier subcutan in den Ohrgrund implantiert wurde.

5.3. Schlußfolgerungen

Mit der Einführung radioimmunologischer Meßverfahren ist es möglich geworden, auch bei unbehandelten Tieren positive Werte bei der Messung von Östrogenen und Gestagenen im Gewebe zu erhalten. Auf Grund dieser

Tatsache läßt sich bei Beurteilung des Rückstandsproblems nach exogener Zufuhr körpereigener Steroidhormone die Forderung nach einer absoluten Rückstandsfreiheit, der sogenannten "Nulltoleranz", nicht mehr aufrechterhalten. Es erscheint hier vielmehr notwendig, Schwellenwerte, d.h. Toleranzgrenzen, zu ermitteln, die sich nach den Hormonkonzentrationen im Gewebe unbehandelter Tiere richten.

Am Beispiel vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei Beachtung einer speziellen Dosierung, sowie des Applikationsortes und der Absetzzeit, zum Zeitpunkt der Schlachtung kein signifikanter Unterschied zwischen dem Östrogen- und Progesterongehalt im Gewebe der unbehandelten und der behandelten Kälber mehr besteht. Daraus kann gefolgert werden, daß es grundsätzlich möglich erscheint, bei exogener Anwendung körpereigener Steroide zur Herbeiführung eines echten anabolen Effektes eine Applikationsform zu finden, die für den Verbraucher risikofrei ist.

Eine mögliche Gefahr könnte für den Verbraucher nur dann auftreten, wenn die Vorschriften bezüglich Dosierung, Behandlungsdauer und Applikationsort nicht eingehalten werden. So kann es z.B. zu erhöhten Östrogenwerten im Gewebe kommen (siehe oben), wenn eine frühzeitige Schlachtung herbeigeführt wird.

Aber auch diese erhöhten Hormonwerte im Gewebe, die ja nur im Nanogramm-bereich liegen, verlieren bei sachlicher Beurteilung einer möglichen Verbraucher-gefährdung jede Bedeutung, wenn die geringe orale Wirksamkeit (siehe Kapitel 2.3.3.) sowie - wie aus Tabelle 56 hervorgeht - die in einer Mahlzeit enthaltenen Rückstände in Relation zu den körpereigen produzierten Östrogen- und Gestagenmengen gesetzt werden. In Tabelle 56 ist zum Vergleich der Größenordnungen auch die von vielen Frauen mit der kontrazeptiven Pille "freiwillig" täglich aufgenommene Östrogen- und Gestagendosis aufgeführt; der Unterschied liegt bei 3 Zehnerpotenzen, zudem ist zu sagen, daß sich die mit der Pille aufgenommenen synthetischen körperfremden Steroide durch eine erhöhte orale Wirksamkeit auszeichnen (Mutschler 1973).

Die geringe orale Wirksamkeit der körpereigenen Steroide bietet auch einen relativen Schutz für den Verbraucher, sollte ausnahmsweise eine Implantationsstelle zum Verzehr kommen. Diese einmalige Dosis - es ist unwahrscheinlich, daß von ein und der selben Person kontinuierlich Implantationsstellen verzehrt werden - kann schlimmstenfalls einen kurzfristigen und reversiblen mehr oder weniger physiologischen Effekt herbeiführen. Einer oft zitierten mutagenen Gefahr

für den heranwachsenden Organismus ist entgegenzuhalten, daß gerade der Foetus mit enormen Mengen mütterlicher Östrogene und Gestagene, d.h. von Progesteron, in Berührung kommt (siehe Tabelle 56).

Auf Grund dieser Hormoneinflüsse kann bei Neugeborenen teilweise eine sekretabsondernde Milchdrüse beobachtet werden, ein Effekt, der jedoch reversibel und ohne nachteilige Folgen für das Neugeborene ist.

Trotz all dieser Gesichtspunkte sollte bei einer eventuellen Tolerierung von Anabolika, auch wenn es sich um solche handelt, die den körpereigenen Östrogenen und Gestagenen entsprechen, eine strenge Regelung der Art der Applikation, der Absetzzeit vor dem Schlachten, der Dosierung und der Galenik getroffen werden, wobei eine Implantationsstelle gewählt werden sollte, die ausschließt, daß sie den Verbraucher erreicht; möglicherweise sollte eine galenische Präparation, die innerhalb einer angemessenen Zeitspanne, jedenfalls vor einem geplanten Schlachtttermin, im Tierkörper vollständig resorbiert wird.

Tab. 56 Größenordnung zur Frage der Östrogen- und Progesteronvorkommen beim Menschen und Rind
(Tabelle ergänzt nach Karg 1973)

Vorkommen	Östrogene	Progesteron
24h-Ausscheidung im Urin bei der trächtigen Kuh	1 g^+	
24h-Ausscheidung im Urin bei der nicht trächtigen Kuh	10^{-2} g^+	
24h-Ausscheidung im Urin bei Schwangerschaft der Frau	10^{-2} g^+	$10^{-1} - 10^{-2} \text{ g}^{++}$
24h-Ausscheidung im Urin beim weiblichen Kalb (10 Wochen)	$10^{-3} - 10^{-4} \text{ g}^+$	
24h-Ausscheidung im Urin bei nicht graviden Frauen	10^{-4} g^+	$10^{-2} - 10^{-3} \text{ g}^{++}$
Dosis kontrazeptive Pille	$10^{-5} - 10^{-6} \text{ g}^+$	10^{-3} g^{++}
24h-Ausscheidung im Urin bei Männern	10^{-6} g^+	
Rückstände an Injektions- stelle beim Rind	$10^{-3} - 10^{-8} \text{ g/kg}^+$	
Meßwerte in vorliegender Arbeit bei unbe- und be- handelten Kälbern	$10^{-9} - 10^{-11} \text{ g/g}$	$10^{-9} - 10^{-10} \text{ g/g}$

+ = Karg 1973

++ = Tausk 1970

6. Zusammenfassung

Mit Hilfe radioimmunologischer Meßverfahren wurden Östron, Östradiol-17 β und Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe, sowie Östron und Östradiol-17 β im Fettgewebe, gemessen. Aufbauend auf bereits vorliegenden Erfahrungen bei der Messung von Östron und Östradiol-17 β im Muskelgewebe gelang es, eine für die Routine geeignete Methodik zur Erfassung dieser Hormone in den oben genannten Geweben zu entwickeln. Als für die Routine besonders geeignet erwiesen sich Homogenisierung und Extraktion in standardisierten Glasscintillationszählküvetten, die Verwendung eines bis zu 120 Proben fassenden automatischen Schüttlers für die Extraktion, die Trennung der organischen von der wässrigen Phase durch Einfrieren der letzteren bei -30° C und das Abdampfen von Lösungsmitteln in einem Vacuuntrockenschrank mit hoher Probenkapazität.

Auch für die Bestimmung von Östron und Östradiol-17 β im Fettgewebe konnte ein Routineverfahren eingerichtet werden. Als gut geeignet erwies sich hier die Extraktion mit Chloroform bei 50° C, wieder unter Verwendung standardisierter Glasscintillationszählküvetten und einem automatischen Schüttler. Durch eine Lösungs- mittelverteilung zwischen 80 %-igem Methanol und

Petroläther, sowie durch Trennen der phenolischen von der neutralen Fraktion gelang es, mitextrahierte Störsubstanzen abzutrennen.

Für die Bestimmung von Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe werden zwei Verfahren vorgestellt, wobei einmal die Messung in der neutralen Fraktion, d.h. nach Abtrennung der Östrogene aus dem gleichen Extrakt, vorgenommen wird und zum anderen nach direkter Gewebsextraktion mit Petroläther und anschließender Lösungsmittelverteilung zwischen Petroläther und 80 %-igem Methanol.

Diese beschriebenen Verfahren wurden in umfangreichen Untersuchungen auf ihre Zuverlässigkeit (Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit) überprüft. Dabei zeigte sich, daß - abhängig vom gemessenen Hormon und vom untersuchten Gewebe - Unterschiede auftraten. Während die Methoden zur Bestimmung von Östradiol-17 β und - mit geringgradigen Einschränkungen (Niere) - auch die für Östron als zuverlässig bezeichnet werden müssen, zeigte sich, daß bei der Bestimmung von Progesteron lediglich für Muskelgewebe die an die Zuverlässigkeit gestellten Ansprüche einigermaßen erfüllt wurden; für die Bestimmung im Lebergewebe ist nur eine qualitative Aussage und auch die nur mit Einschränkungen möglich.

Mit diesen Untersuchungen konnten unter Zugrundelegung des derzeitigen Standes der Analytik erstmals Grenzen radioimmunologischer Bestimmungsmethoden aufgezeigt werden.

Mit den beschriebenen Methoden wurden in einem Modellversuch Untersuchungen an 11 männlichen Mastkälbern durchgeführt, von denen 6 mit einem Kombinationspräparat (20 mg Östradiol-17 β und 200 mg Progesteron) behandelt worden waren.

72 Tage nach der Behandlung konnten - trotz der Tendenz zu geringgradig höheren Werten bei den behandelten Tieren - keine gesicherten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. In jedem Fall lagen die im Muskel-, Leber-, Nieren- und Fettgewebe gemessenen Durchschnittswerte für die Östrogene unter 0,3 ng/g Gewebe und für Progesteron im Muskel-, Leber- und Nierengewebe unter 0,7 ng/g Gewebe.

S u m m a r y

Using radio-immuno-assay techniques (RIA) estrone, estradiol-17 β and progesterone were determined in muscle-, liver- and kidney tissue; similarly estrone and estradiol-17 β were measured in fat tissue. Based upon experiences already present for the measurement of estrone and estradiol-17 β in muscle tissue it was achieved to develop a routine method for the determination of these hormones in the above mentioned tissues. Especially suitable for this routine procedure proved to be the performance of both homogenisation and extraction in standardized glassscintillation vials, the use of an automatic shaker - holding up to 120 samples - for extraction purposes, the separation of the organic and aqueous phase by freezing the latter at -30° C and evaporation of the solvent in a vacuum-drying oven with high sample capacity.

Also for the determination of estrone and estradiol-17 β in fat tissue a routine method was established. As special suitable in this case proved to be the extraction with chloroform at 50° C, again using standardized glassscintillation vials and an automatic shaker. Interfering materials could be separated with a solvent partition between 80 % methanol and petroleumether followed by separating the phenolic from the neutral fraction.

For determination for progesterone in the muscle-, liver- and kidney tissue two kinds of methods were introduced; in one case RIA was performed with the neutral fraction, that is after the separation of the estrogens from the same extract with the phenolic fraction, in the other case RIA was applied after a direct tissue extraction with petroleumether and a following solvent partition between 80 % methanol and petroleumether.

These described methods have been examined in extensive studies for their reliability (specificity, sensitivity, accuracy and reproducibility). Depending on the hormones to be measured and the tissues to be examined differences showed up. While the methods for determination of estradiol-17 β and - with insignificant restrictions (kidney) - also those for the determination of estrone have to be qualified as reliable it showed by determination of progesterone only by muscle tissue the reliability of requirements are met to a certain extent. For the determination in liver tissue only a qualitative statement is possible and even only with restrictions.

On account of these tests on the basis of the present analytic situation it was possible to show limits of

radioimmunological determination methods for the first time.

By means of the described methods tests on eleven male calves were performed in a fattening trial, six of which were treated with a combined preparation of 20 mg estradiol-17 β and 200 mg progesterone. Seventytwo days after treatment no secure differences could be proved - in spite of the tendency to low-grade higher values on the treated animals - between the controlled and the treated group. In each case the average values for the estrogens in the muscle-, liver-, kidney- and fat tissue were below 0,3 ng/g tissue and for progesterone in the muscle-, liver- and kidney tissue below 0,7 ng/g tissue.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Abraham G.E., Tait A.D. 1971

Ovarian metabolism of steroid hormones.

In: Research in reproduction, Vol 3

Edwards R.G., Ed.

The International Planned Parenthood Federation,

18-20 Lower Regent Street, London S.W.1

Adlercreutz H., Luukainen T., 1965a

Gaschromatographic studies on oestrogens in
the bile of pregnant women.

Biochim. Biophys. Acta 97, 134

Adlercreutz H., Luukainen T., 1965b

Isolation and identification of 17a-oestradiol
in the bile of a pregnant cow.

J. Reprod. Fert. 9, 137

Adlercreutz H., 1974

Enterohepatischer Kreislauf der Östrogene in
der Gravidität, bei Lebererkrankungen und nach
Zufuhr von Antibiotika.

Referat vom 18.1.1974 in der Universitäts-
Frauenklinik München

- Andrews F.N., Stob M., Perry T.W., Beeson W.M., 1956
The oral administration of Diethylstilboestrol,
Dienoestrol and Hexoestrol for fattening calves.
J. Anim. Sci. 15, 685
- Barlow J.J., Mac Laren J.A., Pothier L., 1969
In vivo observations on testosterone and
estradiol-17 β protein binding in women.
J. Clin. endocr. 29, 767
- Beck H., Braden A.W., 1951
Studies on the oestrogenic substance in
subterranean clover.
Aust. J. Exp. Med. Sci. 29, 297
- Beeson W.M., Andrews F.N., Stob M., Perry T.N., 1956
The effects of oral estrogens and androgens singly
and in combination on yearling steers.
J. Anim. Sci. 15, 679
- Behr H., 1973
Versuche zur radioimmunologischen Östrogenbestimmung
im Rahmen der Rückstandsanalytik bei Masttieren.
Diss. med. vet., München
- Beiser S.M., Erlanger B.F., Agate F.J., Liebermann S., 1959
Antigenicity of steroid-protein conjugates.
Sci. 129, 564

Bickoff E.M., Booth A.N., Lyman R.L., Livingston A.L.,
Thompson C.R., Deeds F., 1957
Coumestrol a new estrogen, isolated from forage
crops.
Sci. 126, 968

Bickoff E.M., Lyman R.L., Livingston A.L., Booth A.N., 1958
Characterisation of coumestrol, a naturally
occurring plant estrogen.
J. Am. Chem. Soc. 80, 3969

Bickoff E.M., 1961
Estrogen-like substance in plants.
Proc. 22nd Biology Colloquium, Physiology
of Reproduction.
Oregon State University 93

Billiar R.B., Tanaka Y., Knappanberger M., Hernandez R.,
Little B., 1969
Influence of transcortin and albumin on the rate
of reduction of progesterone by human placental
20 α -hydroxysteroid dehydrogenase.
Endocrinology 84, 1152

Borger M.L., Wilson L.G., Sink J.D., Ziegler J.H.,
Davies S.L., 1973
Zeranol and dietary protein level effects on live
performance carcass merit, certain endocrine
factors and blood metabolite levels of steers.
J. Anim. Sci. 36, 706

Bradbury R.B., White D.E., 1951

The chemistry of subterranean clover, isolation
of formononetin and genistein.

J. Chem. Soc, 3447

Bradbury R.B., White D.E., 1954

The chemistry of subterranean clover, synthesis
and reduction of isoflavones related to genistein
and formononetin.

J. Chem. Soc. S. 871

Briggs M.H., Brotherton J., 1970

Target Organ Effects - A. Estrogens and Progestogens
In: Steroid Biochemistry and Pharmacology
Academic Press London and New York, 1970

S. 86

Brown J.B., 1955

A chemical method for the determination of ostriol,
oestrone and oestradiol in human urine

Biochem. J. 60, 185

Brüggemann J., Barth K., Karg H., 1958

Versuche zum Einsatz von Sexualhormonen in
der Rindermast

Z. Tierphys., Tierern. und Futtermittelkunde

13, 321

- Brüggemann J., Karg H., Barth K., 1958
Zur Problematik des Einsatzes von Sexualhormonen
in der Nutztiermast.
Kraftfutter 41, 113
- Brüggemann J., Karg H., 1960
Hormone in der Tiermast.
6. Symposium d. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie
1959, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg
1960, S. 195
- Burroughs W., Culbertson C.C., Kastelic J., Cheng E.,
Hale W.H., 1954
The effects of trace amounts of diethylstilbestrol
in the ration of fattening steers.
Sci. 120, 66
- Burroughs W., Culbertson C.C., Cheng E., Hale W.H.,
Homeyer P., 1955
The influence of oral administration of
diethylstilbestrol to beef cattle.
J. Anim. Sci. 14, 1015
- Bush L.I., Reuber H.W., 1963
Effects of feeding diethylstilbestrol on the
development and reproductive performance of
dairy cattle.
J. Dairy Sci. 46, 740

Butenandt A., Jakobi H., 1933

Über die Darstellung eines kristallisierten
pflanzlichen Tokokinins (Thelykinin) und seine
Identifizierung mit dem Follikelhormon.

Hoppe Seyler 218, 104

Clauberg C., 1930

Zur Physiologie und Pathologie der Sexualhormone
im Besonderen des Hormons des Corpus luteum.

I. Mitteilung: Der biologische Test für das
Luteohormon (das spezifische Hormon des
Corpus luteum)

am infantilen Kaninchen.

Zentr. Gynäkol. 54, 2757

Clegg M.T., Cole H.H., 1954

The action of stilbestrol on growth response
in ruminants.

J. Anim. Sci. 13, 108

Curnow D.H., Robinson T.W., Underwood E.J., 1948

Oestrogenic action of extracts of subterranean
clover.

Aust. J. Exper. Biol. Med. Sci. 26, 171

Curnow D.H., 1954

Oestrogenic activity of subterranean clover.

The isolation of genistein from subterranean clover and methods of quantitative estimation.

Biochem. J. 58, 283

Curnow D.H., Rossiter R.C., 1955

Occurrence of genistein in subterranean clover and other Trifolium species.

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 33, 243

Davies J., Ryan J.K., 1972

The uptake of Progesterone by the uterus of the pregnant rat in vivo and its relationship to cytoplasmic progesterone-binding-protein.

Endocrinology 90, 507

Daughaday W.H., 1958a

Binding of corticosteroids by plasmaproteins

III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasmaprotein fractions as measured by equilibrium dialysis.

J. Clin. Invest. 37, 511

Daughaday W.H., 1958b

Binding of corticosteroids by plasmaproteins

IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin

J. Clin. Invest. 37, 519

- Dinusson W.E., Andrews F.N., Beeson W.M., 1950
The effects of stilbestrol, testosterone,
thyroid alteration and spaying on growth and
fattening of beef heifers.
J. Anim. Sci. 9, 321
- Diszfalusy E, 1952
Progesterone in human placental tissue.
Acta. endocr. (kbh.) 10, 373
- Dodds E.C., Colberg L., Lawson W., Robinson R., 1938
Oestrogenic activity of certain synthetic compounds.
Nature 141, 247
- Doe R.P., Zinneman H.H., Funk E.B., Ulstrom R.A., 1960
Significance of the concentration of nonprotein-
bound plasma cortisol in normal subjects, cushing's
syndrome pregnancy and during estrogen therapy.
J. Clin. endocrin. 24, 1029
- Donaldson L.E., Basset I.M., Thornburn G.D., 1970
Peripheral plasma progesterone concentration of
cows during puberty, oestrus cycles, pregnancy
and lactation and the effect of undernutrition
of exogenous oxytocin on progesterone concentration.
J. Endocrin. 48, 599

Dorfman R.I., Ungar F., 1965

Metabolism of Steroid Hormones

Academic Press New York, London 1965

El Attar T.M.A., Turner W.C., 1957

Spectrophotofluorimetric determination of estrogens
in urine and faeces of cows during different stages
of pregnancy.

Miss. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 641

Engel L.L., 1963

Physical properties of the steroid hormones.

Phargamon press, Oxford - London - New York - Paris

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S., 1957

Steroid-protein conjugates

I. Preparation and characterisation of conjugates
of bovine serum albumin with testosterone and
corticosterone.

J. Biol. Chem. 228, 713

Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Liebermann S. 1959

Steroid-protein conjugates

II. Preparation and characterisation of conjugates
of bovine serum albumin with progesterone,
desoxycorticosterone and estrone.

J. Biol. Chem. 234, 1090

- Faber L.E., Sandmann M.L., Stavely H.E., 1972a
Progesterone-binding proteins of the rat
and rabbit uterus.
J. Biol. Chem. 247, 5648
- Faber L.E., Sandmann M.L., Stavely H.E., 1972b
Progesterone-binding in uterine cytosols of
the guinea pig.
J. Biol. Chem. 247, 8000
- Feil P.D., Glasser S.D., Toft D.O., O'Maaley B., 1972
Progesterone binding in the mouse and the rat uterus
Endocrinology 91, 738
- Ferin M., Zimmering P.E., Liebermann S., van de Wiels R.L.,
1968
Inactivation of the biological effects of exogenous
and endogenous by antibodies of 17 β -estradiol.
Endocrinology 83, 565
- Fieser L.F., Fieser M., 1967
Steroids
Reinhold Publishing Corporation
A Subsidiary of Chapman-Reinhold Inc.
New York, Amsterdam, London
- Ganong W.F., 1965
Review of medical physiology.
2. Auflage
Lange Medical Publications, Los Altos, California

- Gassner F.X., Martin R.P., Algeo W.I., 1960
Hormone in der Tiermast.
6. Symposium d. dtsh. Gesellschaft f. Endokrinologie,
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg S. 151
- Glasscock R.F., Smith R.W., 1970
A study of the metabolism of phenolic
oestrogen in ruminant.
II. Chemical fractionation of radioactivity
recovered from various tissues after
injection with tritiated hexoestrol.
Annales de Biologie, Animale Biochimie,
Biophysique 10, 343
- Goodfriend L., Sehon A.H., 1958
Preparation of an estrone-protein conjugate.
Canad. J. Biochem. Physiol. 36, 1177
- Goodfriend L., Sehon A.H., 1961a
Antibodies to estrone-protein conjugates.
I. Immunological studies
Canad. J. Biochem. Physiol 39, 941
- Goodfriend L., Sehon A.H., 1961b
Antibodies to estrone-protein conjugates.
II. Endocrinological studies
Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 961

Goodfriend L., Sehon A.H., 1970

Early approaches to production analysis and use
of steroid-specific antisera.

In: Immunological methods in steroid determination.

Eds. Péron F.G. and Caldwell B.V.

Appleton-Century-Crofts

New York p. 15

Gross S.I., 1970

Specificities of steroid antibodies.

In: Immunological methods in steroid determination.

Péron F.G. and Caldwell B.V., Eds.

Appleton-Century-Crofts

New York p. 41

Guggolz I., Livingston A.L., Bickoff E.M., 1962

Detection of Daidzein, Formononetin, Genistein,
Biochanin A in forages.

J. Sci. Food Agric. 13, 304

Hale W.H., Ray D.E., 1973

Efficacy of oral estradiol-17 β for growing
and fattening steers.

J. Anim. Sci. 37, no. 5 p. 1246

Hammer C., 1965

Modellversuche an Ratten zur Frage der Wirksamkeit
minimaler Östrogendosierungen und von Tranquilizern
auf Wachstum und endokrine Testesfunktion.

Diss. med. vet. München

Haraszti J., Feher T., Baksai E.H., 1968

Excretion of pregnandiol by cows during cycle.

Acta Vet. Acad. Scient. Hungaricae 18, 373

Hayano M., Saba N., Dorfman R.I., Hechter O., 1956

Some aspects of the biogenesis of adrenal
steroid hormones.

Rec. Prog. Horm. Res. 12, 79

Hechter O., Soifer D., 1971

Involvement of the adenyl cyclase 3',5'-AMP System
in steroid hormone action.

In: Basic actions of sex steroids on target organs.

Eds. Hubinont P.O., Leroy F., Galand P.,

S. Karger Basel, München, Paris, London,
New York, Sydney

Hinds F.C., Draper H.H., Mitchell G.E.jr., Neumann A.L., 1965

Metabolism of labelled diethylstilbestrol
in ruminants.

J. Agr. Food. Chem. 13, 257

Hoffmann W., Forbes T.R., Westphal U., 1969

Biological inactivation of progesterone by
interaction with corticosteroid binding globulin
and with albumin.

Endocrinology 85, 778

Hoffmann B., 1971a

Bestimmung von Östrogenen

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 14 Abstract

Hoffmann B., 1971b

Embryonaler Fruchttod bei einer Kuh im Anschluß
an eine Besamung - nachgewiesen mit Hilfe der
Progesteronbestimmung im Blut.

Zuchthygiene 6, 134

Hoffmann B., Karg H., 1971a

Versuche zur radioimmunologischen Östrogenbestimmung
im Rinderblut.

Zuchthygiene 6, 77 Abstract

Hoffmann B., Karg H., 1971b

Versuche zur Bestimmung von Östrogenen Hormonen
im peripheren Rinderblut mit einem radioimmuno-
logischen Verfahren.

Acta endocr. (Kbh), Suppl. 152, 55 Abstract

Hoffmann B., 1972

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind.
Entwicklung von Meßverfahren und physiologischen
Daten.

Habilitationsschrift, Fakultät für Landwirtschaft
und Gartenbau der Technischen Universität München

Hoffmann B., Hamburger R., 1973

Progesteron in der Milch: Radioimmunologische
Bestimmung zur Gelbkörperfunktion und
Milchfettkonzentration.

Zuchthygiene 8, 154

Hoffmann B., Karg H., 1973

Determination of Tissue-Levels of Steroid-Oestrogens
in the Bovine using a Radioimmunological Technique.
9th Acta Endocrinological Congress
Abstract No. 44 Suppl. 177

Hoffmann B., Kyrein H.J., Ender M.L., 1973

An Efficient for the Determination of Progesterone
by Radio-immuno-assay Applied to Bovine Peripheral
Plasma.

Hormone Res. 4, 302

- Hoffmann B., Karg H., Vogt K., Kyrein H.J., 1974
Rückstände von Bioziden und Umweltchemikalien
im Fleisch.
DFG-Kolloquium, Manuskript im Druck
Bonn 22.3.1974
- Hooker C.W., Forbes T.R., 1947
Specifity of the intrauterine test for progesterone.
Endocrinology 45, 71
- Huis in't Veld L.G., Verdonk A.R., Kok G.L., 1971
The value of Tiecco's uterine weight test
(1969/1968) in examining foodstuffs and cattle
feeds for oestrogenic hormonoids.
(unveröffentlichte Ergebnisse)
- Hurlock B., Talalay P., 1957
Enzymatic estimation of steroids in human urine.
J. Biol. Chem. 227, 27
- Hurlock B., Talalay P., 1958
Enzymatic estimation of steroids in human urine.
Endocrinology 62, 201
- Jensen E.V., Suzuki T., Numata M., Smith S.,
De Sombre E.R., 1969
Estrogen-binding substances of target tissues.
Steroids 13, 451

Jöchle W., 1969

Zootechnische Indikationen in der Haustierhaltung,
der Tierzucht und der tierischen Produktion.

Wachstumsbeeinflussung und hormonale Mast
mit Gestagenen.

In: Die Gestagene, Handbuch der experimentellen
Pharmakologie 22 II. S. 894

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Ittrich G., 1960

Eine Methode für die klinische Routinebestimmung
der Harnöstrogene

Zbl. Gynäk. 82, 429

Johansson E.D.B., 1969

Progesterone levels in peripheral plasma during
luteal phase of the normal human menstrual cycle
measured by a rapid competitive protein binding
technique.

Acta. Endocrinol. (Copenh.) 61, 592

Jungblut P.W., Mc Cann S., Görlich L., Rosenfeld G.C.,

Wagner R., 1969

Binding of steroids by tissue proteins, "Research
of Steroids" Vol. IV

4th Meeting of the int. Study Group for steroid hormones
Rome Dec. 1969

Pergamon Press, Oxford 1970, S. 213

Jungblut P.W., 1971

Diskussion auf der Tagung:

Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungsmethoden zur Bestimmung von Steroidhormonen.

Tagung, Schloß Auel, 12. und 13. Nov. 1971

Junkmann K., 1968

Konstitution und chemische und physikalische Eigenschaften der Gestagene.

In: Die Gestagene, Handbuch der experimentellen Pharmakologie 22, I. S. 1

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Kahwanago I., Heinrichs W.L., Herrmann W.L., 1969

Isolation of oestradiol "receptors" from bovine hypothalamus and anterior pituitary gland.

Nature 223, 313

Karg H., 1958

Untersuchungen an Gonaden, Nebennieren und Thymen über einige endokrine Korrelationen, sowie deren Beziehungen zum Wachstum.

Habilitationsschrift München

Karg H., 1964

Probleme bei der Anwendung von Östrogenen Hormonen bei Masttieren.

Arch. f. Lebensmittelhygiene 15, 132

Karg H., 1966

Hormonale Wirkstoffe in der Mast.

Z. f. Tierzüchtung und Züchtungsbiologie 82, 154

Karg H., 1970

Physiologische Grundlagen der Steuerung des
Sexualzyklus.

Tierzüchter 22, 63

Karg H., Hoffmann B., Vogt K., Behr H., 1972

Radioimmunologische versus fluorimetrische
Bestimmung exogener und endogener Steroidöstrogene
bei Mastkälbern.

Tierärztliche Umschau 27, 385

Karg H., 1973

Lebensmittelhygienische Aspekte beim Einsatz
von Östrogenen in der Nutztiermast.

Archiv für Lebensmittelhygiene 4, 77

Karg H., Kyrein H.J., Hoffmann B., 1973

Development of a radio-immuno-assay for tren-
bolonacetate and oestradiolbenzoate and characteri-
zation of both compounds concerning their affinity
to uterine oestrogen receptors.

J. Anim. Sci. 37, 256

Karlson P., 1970

Kurzes Lehrbuch der Biochemie

7. Auflage

Georg Thieme Verlag Stuttgart

Kato J., Villet C.A., 1967

Preferential uptake of estradiol by the
anterior hypothalamus of the rat.

Endocrinology 80, 567

Kato J., Atasumi Y., Inaba M., 1971

Development of estrogen receptors in the
rat hypothalamus.

J. Biochem. 70, 1951

Kato J., 1973

Localization of oestradiol receptors in the
rat hypothalamus.

Acta Endocrin. Kbh. 72, 663

Kilkenny J.B., Sutherland J.E., 1970

The use of hormone administration in
commercial beef production in the U.K.

Vet. Rec. 87, 734

King L.F., Franks W.R., 1941

The conjugation of estrogens with protein.

J. Am. Chem. Soc. 63, 2042

Klopper A., 1956

The excretion of pregnandiol during normal
menstrual cycle.

J. Endocr. 13, 291

Klostermann E.W., Cahill V.R., Kunkle L.E., Moron H.M., 1955

The subcutaneous implantation of stilbestrol
in fattening bulls and steers.

J. Animal. Sci. 14, 1050

Kolb E., 1967

Die Hormone.

In: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.

2. Auflage

VEB Gustav Fischer Verlag Jena S. 98

Korenmann S.G., 1970

Relation between estrogen inhibitory activity
and binding to cytosol of rabbit and human uterus.

Endocrinology 87, 1119

Korenmann S.G., Dukes B.A., 1970

Specific estrogen binding by the cytoplasm of
human breast carcinoma.

J. Clin. Endocr. 30, 639

Kuss E., Goebel R., 1972a

Synthese von Antigenen mit Östrogenen als
determinante Gruppen.

In: Fortschritte der klinischen Chemie;
Enzyme und Hormone.

Kaiser E., Ed.

Verlag der Wiener medizinischen Akademie, S. 519

Kuss E., Goebel R., 1972b

Determination of estrogens by radio-immuno-assay
with estrogen - C - conjugate antibodies

I. Synthesis of Estrone-, Estradiol-17 β - and
Estriol - 6 - Albumin Conjugates.

Steroids 19, 509

Lamming G.E., 1963

Physiological aspects of growth with particular
reference to castration and the use of hormones.

Referat British Soc. Animal Production

Landsteiner K., 1933

Die Spezifität der serologischen Reaktionen.

Springer Verlag Berlin

Landsteiner K., 1945

Specifity of serological reactions.

Cambridge (Mass.): Harvard University Press

Langecker H., Damrosch L., 1968

Das Vorkommen des Progesterons, seiner Vorstufen
und Stoffwechselprodukte in Organen, Geweben,
Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen.

In: Die Gestagene.

Handbuch der experimentellen Pharmakologie 22/1 S. 34
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Liebermann S., Erlanger B.F., Beiser S.M.,

Agate F.J.jr., 1959

Steroid-protein conjugates: Their chemical, immuno-
chemical and endocrinological properties.

Rec. Prog. Horm. Res. 15, 165

McPhail M.K., 1935

The assay of progesterone.

J. Physiol. 83, 145

Mellin T.N., Erb R.E., Estergreen V.L., 1965

Quantitative estimation and identification of
estrogens in bovine urine.

J. Dairy Sci. 48, 895

Mellin T.N., Erb R.E., 1965

Estrogens in the bovine - a review.

J. Dairy Sci. 48, 678

Mellin T.N., Erb R.E., 1966

Estrogen metabolism and excretion during the
bovine estrus cycle.

Steroids 7, 589

Mercier-Bodard C., Alfzen A., Baulieu E.E., 1970

Sex steroid binding plasma protein (SBP)

In: Steroid assay by protein-binding.

Karolinska Symposia on Research Methods in

Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium

Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 147, 204

Milgrom E., Baulieu E.E., 1970a

Progesterone in uterus and plasma.

I. Binding in rat uterus

105,000 g Supernatant

Endocrinology 87, 276

Milgrom E., Baulieu E.E., 1970b

Progesterone in the uterus and plasma.

II. The role of hormone availability and metabolism
on selective binding to uterus protein.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 723

Milgrom E., Perrot M., Atger M., Baulieu E.E., 1972a

Progesterone in uterus and plasma.

V. An assay of the progesterone cytosol receptor
of the guinea pig uterus.

Endocrinology 90, 1064

- Milgrom E., Atger M., Perrot M., Baulieu L.E., 1972b
Progesterone in uterus and plasma.
VI. Uterine progesterone receptors during the
estrus cycle and implantation in the guinea pig.
Endocrinology 90, 1071
- Mikhail G., Wu C.H., Ferin M., van de Wiele R.L., 1969
Radio-immuno-assay of plasma estrone and estradiol.
Steroids 15, 333
- Murphy B.E.P., Engelberg W., Pattee C.J., 1963
Simple method for the determination of
plasma corticoids.
J. Clin. endocr. 23, 293
- Murphy B.E.P., 1964
Application of the property of protein binding
to the assay of minute quantities of hormones
and other substances.
Nature (Lond.) 201, 679
- Murphy B.E.P., 1967
Some studies on the protein binding of steroids
and their application to the routine micro and
ultramicro measurement of various steroids in body
fluids by competitive protein binding radio-assay.
J. Clin. endocr. 27, 973

Murphy B.E.P., 1968

Binding of testosterone and estradiol in plasma.

Canad. J. Biochem. 46, 299

Mutschler E., 1973

Arzneimittelwirkungen.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart

S. 218

Neill I.D., Johanson E.D.B., Datta I.K., Knobil E., 1967

Relationship between the plasma levels of
luteinizing hormone and progesterone during the
normal menstrual cycle.

J. Clin. endocr. 27, 1167

Niswender G.D., Midgley A.R.jr., 1970

Hapten-radio-immuno-assay for steroid hormone.

In: Immunological methods in steroid determination.

Péron F.G. and Caldwell B.V., Eds.

Appleton Century Crofts, New York, S. 149

Pearlman W.H., Rakoff A.E., Cantarow A., Paschkis E.K., 1947

The isolation of estrone from bile of a pregnant cow.

J. Biol. Chem. 170, 174

Pearlman W.H., Cerceo E., 1962

The isolation of progesterone from human placenta.

J. Biol. Chem. 198, 79

Perklev T., 1964

Distribution and excretion of radioactivity after
parenteral administration of radioactive polydiethyl-
stilbestrol phosphate to rats and a cow.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 394

Perry T.W., Stob M., Huber D.M., Peterson R.C.,

Beeson W.M., 1968

Resorcylic acid lactone for growing and
finishing beef cattle.

Purdue University, Cattle Feeders Day Report

19. April 1968

Pope G.S., 1953

Oestrogenic isoflavones in red clover and
subterranean clover.

Chem. a. Ind. Proc. 1092

Prändl O., 1964

Diskussion in "Östrogene in der Tiermast"

Arch. f. Lebensmittelhygiene 15, 132

Preston R.L., Martin J.E., Blakely J.E., Pfander W.N., 1965

Structural requirements for the growth response
of certain estrogens in ruminants.

J. Anim. Sci. 24, 338

Roberts S., Szego C.M., 1946

The nature of circulating estrogens:

Lipoprotein-bound estrogen in human plasma.

Endocrinology 39, 183

Roberts S., Szego C.M., 1953

Steroid interaction in the metabolism of
reproductive target organs.

Physiol. Rev. 33, 593

Roberts S., Szego C.M., 1955

Biochemistry of the steroid hormones.

Ann. Rev. Biochem. 24, 543

Robinson T.W., 1949

Oestrogenic potency of subterranean clover;
the preparation and assay of extracts.

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 27, 297

Rommel P., Zschintzsch A., 1965

Isolierung von Östron und 17a-Östradiol aus
Gallenflüssigkeit des neugeborenen Kalbes durch
Mikrosublimation.

Acta endocr. (Kbh.) 50, 47

Sandberg A.A., Kirandi R.Y., Varkarakis M.J.,

Murphy G.P., 1973

Estrogen Receptor Protein of Pancreas

Roswell Park Memorial Institute Buffalo, New York 14203

Scheunert A., Trautmann A., 1965

Endokrinium.

In: Lehrbuch der Veterinär-Physiologie

5. Auflage

Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg

Schole I., 1966

Theorie der Stoffwechselregulation unter besonderer
Berücksichtigung der Regulation des Wachstums.

Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg

Beiheft 5 zum Zentralblatt für Veterinärmedizin

Sharp G.D., 1969

Metabolic response of ruminants to zearalanol.

P.H.D. thesis Washington State University

Short R.V., 1957

Progesterone and related steroids in the blood
of domestic animals.

Ciba Found. Coll. Endocr. 11, 362

Short R.V., Moore N.W., 1959

Progesterone in blood.

V. Progesterone and 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one
in the placenta and blood of ewes.

J. Endocr. 19, 288

Short R.V., 1960

Blood progesterone levels in relation to parturition.

J. Reprod. Fert. 1, 61

Short R.V., 1962

Steroid concentration in normal follicular
fluid and ovarian cysts fluid from cows.

J. Reprod. Fert. 4, 27

Sinell H.J., 1964

Diskussion in "Östrogen in der Tiermast".

Vortragsveranstaltung der Gesellschaft für
Ernährungsbiologie a, 11. Juli 1963 in München.

Archiv für Lebensmittelhygiene 15, 159

Skarzynski B., 1933

An oestrogenic substance from plant material.

Nature (Lond.) 131, 766

Slaunwhite W.R.jr., Sandberg A.A., 1959

Transcortin, a corticosteroid-binding protein
of plasma.

J. Clin. Invest. 38, 384

Stob M., Perry T.W., Andrews F.N., Beeson W.M., 1956

Residual Estrogen in the tissue of cattle
treated orally with Diethylstilbestrol,
Dienestrol, Hexestrol and Chlortetracycline.

J. Anim. Sci. 15, 997

Stob M., Baldwin R.S., Tuite J., Andrews F.N.,

Gillette K.G., 1962

Isolation of an anabolic uterotrophic compound
from corn infected with Gibberella Zeae.

Nature 196, 1318

Sutherland E.W., 1972

Studies on the mechanism of hormone action.

Science 177, 401

Szego C.M., Roberts S., 1946

The nature of circulatory estrogens.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 61, 161

Szego C.M., Roberts S., 1953

Steroid action and interaction in uterine metabolism.

Rec. Progr. Horm. Res. 8, 419

Talalay P., Marcus P.I., 1956

Specificity, kinetics and inhibition of a
 α - and β -hydroxysteroid dehydrogenase.

J. Biol. Chem. 218, 675

Tausk M., 1970

Pharmakologie der Hormone.

Georg Thieme Verlag Stuttgart

Tiews J., Gropp J., Boehnke E., 1972

Studies on the effect of an anabolic agent
(oestradiol-benzoate-trienbolone) on nitrogen-
retention in fattening calves.

Proceedings of the international meetings on
use of oestrogens in cattle breeding

19 mai 1972 Paris

Velle W., 1958

Studies on oestrogens in cattle: urinary
oestrogen excretion by the newborn calf.

Acta endocr. (Kbh.) 29, 381

Vogt K., Waldschmidt M., Karg H., 1972

Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und
Rückständen von Östradiol beim Kalb nach
intramuskulärer bzw. subcutaner Implantation
vom Preßlingen mit entsprechendem Östrogengehalt.

Arch. Lebensmittelhygiene 4, 70

van der Wal P., van Weerden E.J., Berende P.L.M.,

Hellemond K.K., 1972

The influence of anabolics on performance and
nitrogen-retention of veal calves.

Proceedings of the international meetings on
use of oestrogens in cattle breeding

19 mai 1972 Paris S. 13

van der Wal P., Berende P.L.M., 1973

Effect of anabolics on performance of calves.

Presented at the 65th annual meeting of the
American Society of Animal Science, Lincoln Nebraska
July 31, 1973

van der Wal P., van Weerden E.I., 1973

Effect of anabolics on nitrogen-retention of calves.
Presented at the 65th annual meeting of the
American Society of Animal Science, Lincoln Nebraska
July 31, 1973

Westphal U., Forbes T.R., 1963

Biological inactivation of Progesterone by binding
to alpha-1 acid glycoprotein (orosomucoid).
Endocrinology 73, 504

Westphal U., 1971

Effect of protein binding on hormonal
activity of steroids.

In: Steroid-Protein Interactions.

Eds. Gross F., Labhart A., Mann T.,

Samuels L.T., Zander J.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York p. 434

Wickersham D.E.W., Schultz L.H., 1964

Response of dairy heifers to DES.

J. Anim. Sci. 23, 177

Wiest W.G., Rao B.R., 1972

Progesterone binding proteins in rabbit
uterus and human endometrium.

Advances in the Biosciences Vol. 7, 251

Pergamon Press New York

Wilson L.L., Rugh M.C., Stout J.M., Simpson M.J.,

Long T.A., Purdy H.R., 1970

Influence of melengestrol acetate and energy intake
upon weight and milk yield and composition of
Angus-Holstein cows and progeny growth rate.

J. Anim. Sci. 31, 956

Wong E., 1962

Detection and estimation of estrogenic
constituents in the red clover.

J. Sci. Food Agric. 13, 304

Young A.W., Cundiff L.V., Bradley N.W., 1969

Effects of an oral progesterone on feedlot heifers.

J. Anim. Sci. 28, 224

8. Tabellenanhang

Einzelwerte zu den in Kapitel 3.2. errechneten
Daten.

Tab. 11 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5
Wiederfindung	0,140	0,216	0,484
in (ng)	0,084	0,210	0,660
	0,134	0,182	0,477
	0,111	0,236	0,544
	0,127	0,217	0,496

Tab. 12 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,046	0,236	0,473	0,987
in (ng)	0,117	0,159	0,450	1,074
	0,152	0,296	0,447	0,965
	0,057	0,229	0,455	1,176
	0,104	0,211	0,432	1,053

Tab. 13 Wiederfindung abgestufter Mengen von Ostron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Einzelergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,046	0,236	0,473	0,987
in (ng)	0,117	0,159	0,450	1,074
	0,152	0,296	0,447	0,965
	0,057	0,229	0,455	1,176
	0,104	0,211	0,432	1,053
	0,140	0,216	0,484	0,663
	0,084	0,210	0,660	1,044
	0,134	0,182	0,477	
	0,111	0,236	0,544	
	0,127	0,217	0,496	
	0,084	0,178	0,534	
	0,107	0,269	0,549	
	0,100	0,166	0,507	
	0,156	0,194	0,511	

Tab. 14/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,325	0,350	1,163	1,470
in (ng)	0,303	0,394	0,600	1,453
	0,024	0,245	1,083	1,381
	0,093	0,044	0,989	1,020
	0,419	0,103	0,475	1,304

Tab. 14/2 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,451	0,365	0,445	1,112
in (ng)	0,083	0,535	0,649	1,133
	0,211	0,650	0,542	1,545
	0,189	0,638	0,564	1,101
	0,209	0,594	0,658	0,950

Tab. 14 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,325	0,350	1,163	1,470
in (ng)	0,303	0,394	0,600	1,453
	0,024	0,245	1,083	1,381
	0,093	0,044	0,989	1,020
	0,419	0,103	0,475	1,304
	0,451	0,365	0,445	1,112
	0,083	0,535	0,649	1,133
	0,211	0,650	0,542	1,545
	0,189	0,638	0,564	1,101
	0,209	0,594	0,658	0,950
	0,119	0,135	0,531	0,781
	0,070	0,173	0,566	0,949
	0,116	0,217	0,638	0,804
	0,198	0,177	0,500	1,027
	0,053	0,189	0,695	0,737
	0,095	0,218	0,655	0,991
		0,215	0,510	1,040
		0,155	0,505	0,810
		0,279	0,531	
		0,172	0,509	
			0,520	
			0,804	
			0,737	
			0,991	

Tab. 15/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,114	0,335	0,263	1,036
in (ng)	0,437	0,201	0,664	1,324
	0,082		0,213	1,788
	0,053		0,494	1,498
	0,182		0,430	1,345

Tab. 15 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,114	0,335	0,263	1,036
in (ng)	0,437	0,201	0,664	1,324
	0,082		0,213	1,788
	0,053		0,494	1,498
	0,182		0,430	1,345
	0,116	0,218	0,562	1,330
	0,115	0,312	0,570	0,959
	0,014	0,339	0,482	
	0,042	0,147	0,480	
	0,069	0,202	0,565	
	0,068	0,203	0,579	
	0,134		0,350	
	0,122		0,550	

Tab. 16/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
 zugesetzt zu 1 g Fettgewebe
 Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,178	0,410	0,970
in (ng)	0,133	0,607	1,170
	0,182	0,520	

Tab. 16/2 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
 zugesetzt zu 1 g Fettgewebe
 Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,114	0,269	0,370
in (ng)	0,256	0,490	1,831
	0,199	0,269	

Tab. 16/3 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
 zugesetzt zu 1 g Fettgewebe
 Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,240	0,500	1,010
in (ng)	0,200	0,510	1,060
	0,280	0,440	0,730
		0,350	0,850

Tab. 16 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
 zugesetzt zu 1 g Fettgewebe
 Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,178	0,410	0,970
in (ng)	0,133	0,607	1,170
	0,182	0,520	
	0,114	0,269	0,370
	0,256	0,490	1,831
	0,199	0,269	
	0,240	0,500	1,010
	0,200	0,510	1,060
	0,280	0,440	0,730
		0,350	0,850
	0,120	0,440	0,900
	0,110	0,650	
	0,250		
	0,194	0,540	1,099
	0,138	0,582	1,308
	0,205	0,799	0,862

Tab. 17 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,088	0,230	0,454	0,742
in (ng)	0,096	0,115	0,524	1,097
	0,152	0,159	0,540	0,918
	0,069	0,192	0,510	
	0,144	0,180	0,589	

Tab. 18 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,106	0,257	0,518	0,954
in (ng)	0,088	0,222	0,399	0,972
	0,059	0,255	0,468	1,261
	0,061	0,210	0,549	0,979
	0,103	0,259	0,454	0,751

Tab. 19 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östron
zu Wasser zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung in (ng)	0,088	0,230	0,454	0,742
	0,096	0,115	0,524	1,097
	0,152	0,159	0,540	0,918
	0,069	0,192	0,510	
	0,144	0,180	0,589	
	0,106	0,257	0,518	0,954
	0,088	0,222	0,399	0,972
	0,059	0,255	0,468	1,261
	0,061	0,210	0,549	0,979
	0,103	0,259	0,454	0,751
	0,064	0,091	0,350	0,739
	0,056	0,113	0,426	0,652
	0,092	0,126	0,350	0,802
	0,105	0,117	0,385	0,720
	0,081	0,117	0,484	0,734
	0,093	0,097	0,465	0,450
	0,087	0,191	0,507	1,127
	0,086	0,153	0,539	1,036
	0,084	0,148	0,461	1,170
	0,079	0,177	0,378	1,028
	0,087	0,190	0,630	1,102
	0,108	0,265	0,636	1,115
		0,217	0,581	0,750
		0,190	0,487	0,930
		0,175	0,540	1,420
			0,528	1,040
				1,280
				1,140
				0,540
				1,150
				0,760
				0,870
				0,940

Tab. 20 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5
Wiederfindung	0,090	0,275	0,536
in (ng)	0,110	0,205	0,540
	0,120	0,237	0,566
	0,102	0,215	0,529
	0,121	0,246	0,355

Tab. 21 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,064	0,088	0,402	0,993
in (ng)	0,081	0,103	0,302	0,947
		0,240	0,329	0,946
		0,228	0,326	0,914
		0,203	0,351	1,108

Tab. 22 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,090	0,275	0,536	
in (ng)	0,110	0,205	0,540	
	0,120	0,237	0,566	
	0,102	0,215	0,529	
	0,121	0,246	0,355	
	0,064	0,088	0,402	0,993
	0,081	0,103	0,302	0,947
		0,240	0,329	0,946
		0,228	0,326	0,914
		0,203	0,351	1,108
	0,082	0,154	0,429	0,898
	0,074	0,170	0,419	0,909
	0,110	0,202	0,466	
	0,097	0,204	0,416	
	0,091	0,273	0,525	
	0,099	0,209	0,474	

Tab. 23/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,096	0,159	0,521	1,187
in (ng)	0,079	0,206	0,500	1,153
	0,101	0,219	0,529	1,121
	0,088	0,145	0,520	1,237
	0,082	0,204	0,557	1,413

Tab. 23/2 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,113	0,174	0,493	0,855
in (ng)	0,102	0,169	0,478	0,837
	0,103	0,167	0,591	0,690
	0,118	0,190	0,548	0,575
	0,118	0,189	0,529	0,767

Tab. 23 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,096	0,159	0,521	1,187
in (ng)	0,079	0,206	0,500	1,153
	0,101	0,219	0,529	1,121
	0,088	0,145	0,520	1,237
	0,082	0,204	0,557	1,413
	0,113	0,174	0,493	0,855
	0,102	0,169	0,478	0,837
	0,103	0,167	0,591	0,690
	0,118	0,190	0,548	0,575
	0,118	0,189	0,529	0,767
	0,137	0,167	0,530	1,070
	0,081	0,198	0,464	1,260
	0,098	0,170	0,525	1,253
	0,060	0,224	0,480	0,810
	0,024	0,197	0,609	1,221
	0,016	0,137	0,413	1,266
	0,080	0,201	0,430	
	0,177	0,211	0,426	
	0,046	0,129	0,375	
		0,114	0,395	
		0,153	0,513	
		0,125	0,406	
		0,159	0,288	
			0,315	

Tab. 24/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,081	0,177	0,494	0,821
in (ng)	0,067	0,145	0,487	0,835
	0,087	0,183	0,501	0,784
	0,064	0,140	0,427	0,982
	0,061	0,140	0,496	0,930

Tab. 24 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,081	0,177	0,494	0,821
in (ng)	0,067	0,145	0,487	0,835
	0,087	0,183	0,501	0,784
	0,064	0,140	0,427	0,982
	0,061	0,140	0,496	0,930
	0,110	0,197	0,540	1,070
	0,066	0,276	0,542	1,260
	0,044	0,268	0,638	1,253
	0,052	0,209	0,473	0,810
	0,102	0,186	0,473	
		0,102	0,545	1,221
		0,256	0,585	1,266
		0,197		
		0,276		

Tab. 25/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fettgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,179	0,460	1,130
in (ng)	0,165	0,465	1,140
	0,179		

Tab. 25/2 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fettgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,081	0,577	0,778
in (ng)	0,115	0,387	1,386
	0,155	0,555	

Tab. 25/3 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fettgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,230	0,390	1,105
in (ng)	0,220	0,480	1,191
	0,220	0,610	1,290
		0,580	1,000

Tab. 25/4 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fettgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,202	0,416	1,221
in (ng)	0,136	0,572	0,875
	0,145	0,569	

Tab. 25 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu 1 g Fettgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,179	0,460	1,130
in (ng)	0,165	0,465	1,140
	0,179		
	0,081	0,577	0,778
	0,115	0,387	1,386
	0,155	0,555	
	0,230	0,390	1,105
	0,220	0,480	1,191
	0,220	0,610	1,290
		0,580	1,000
	0,202	0,416	1,221
	0,136	0,572	0,875
	0,145	0,569	
	0,200	0,510	
	0,140	0,680	
	0,100	0,710	
	0,291		1,509
	0,268		1,517
	0,290		1,070
			1,230

Tab. 26 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,075	0,203	0,202	0,907
in (ng)	0,081	0,196	0,443	0,913
	0,066	0,145	0,560	0,701
	0,071	0,206	0,637	
	0,082	0,183	0,542	

Tab. 27 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,105	0,141	0,500	0,827
in (ng)	0,076	0,155	0,439	0,802
	0,085	0,153	0,517	1,196
	0,058	0,163	0,446	0,885
	0,087	0,177	0,530	0,570

Tab. 28 Wiederfindung abgestufter Mengen von Östradiol-17 β
zu Wasser zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,1	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,075	0,203	0,202	0,907
in (ng)	0,081	0,196	0,443	0,913
	0,066	0,145	0,560	0,701
	0,071	0,206	0,637	
	0,082	0,183	0,542	
	0,105	0,141	0,500	0,827
	0,076	0,155	0,439	0,802
	0,085	0,153	0,517	1,196
	0,058	0,163	0,446	0,885
	0,087	0,177	0,530	0,570
	0,079	0,191	0,435	1,099
	0,083	0,190	0,434	1,069
	0,078	0,122	0,469	1,141
	0,061	0,137	0,548	1,129
	0,099	0,181	0,590	0,981
	0,080	0,188	0,469	1,033
	0,083	0,165	0,525	1,178
	0,094	0,145	0,627	1,017
	0,092	0,199	0,570	1,014
	0,101	0,172	0,431	1,008
	0,110	0,215	0,519	0,968
	0,099	0,215	0,454	0,986
	0,194		0,533	1,036
	0,189		0,570	1,008
			0,530	1,152
			0,517	1,105
				1,440
				1,440
				1,110
				1,290
				0,700
				1,510
				0,830
				0,990
				1,040

Tab. 29 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,162	0,581	0,895
in (ng)	0,169	0,731	0,849
	0,122	0,579	0,983
	0,109	0,694	0,990
	0,189	0,580	0,941

Tab. 30 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,182	0,385	0,769
in (ng)	0,233	0,373	0,482
	0,208	0,300	0,675
	0,175	0,370	0,390
	0,201	0,398	0,630

Tab. 31 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Muskelgewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,162	0,581	0,895
in (ng)	0,169	0,731	0,849
	0,122	0,579	0,983
	0,109	0,694	0,990
	0,189	0,580	0,941
	0,182	0,385	0,769
	0,233	0,373	0,482
	0,208	0,300	0,675
	0,175	0,370	0,390
	0,201	0,398	0,630
	0,090	0,400	0,850
	0,090	0,410	0,840

Tab. 32 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,224	0,413	0,695
in (ng)	0,272	0,366	0,333
	0,244	0,177	0,861
	0,174	0,453	0,803
	0,237	0,339	0,643

Tab. 33 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,158	0,295	0,455
in (ng)	0,091	0,291	0,462
	0,160	0,405	0,627
	0,171	0,291	0,585
	0,148	0,213	0,566

Tab. 34 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Lebergewebe zugesetzt
Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,224	0,413	0,695
in (ng)	0,272	0,366	0,333
	0,244	0,177	0,861
	0,174	0,453	0,803
	0,237	0,339	0,643
	0,158	0,295	0,455
	0,091	0,291	0,462
	0,160	0,405	0,627
	0,171	0,291	0,585
	0,148	0,213	0,566
	0,080	0,200	1,060
	0,080	0,190	0,990

Tab. 35 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
zu 1 g Nierengewebe zugesetzt
Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,023	0,428	0,786
in (ng)	0,252	0,500	0,640
	0,040	0,210	0,370
	0,036	0,484	1,104
		0,349	1,000

Tab. 36/1 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
 zugesetzt zu Wasser
 Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,217	0,772	1,055
in (ng)	0,217	0,464	1,000
	0,257	0,500	0,824
	0,174	0,637	0,865
	0,232	0,335	0,970
	0,195	0,586	1,052
	0,193	0,472	1,040
	0,203	0,689	1,036

Tab. 36/2 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
 zugesetzt zu Wasser
 Ergebnisse eines Versuchs

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,181	0,427	0,987
in (ng)	0,250	0,468	1,069
	0,328	0,481	1,020
	0,182	0,463	1,109
	0,195	0,462	1,042
	0,215	0,512	1,007
	0,267	0,436	1,132
		0,531	

Tab. 36 Wiederfindung abgestufter Mengen von Progesteron
 zugesetzt zu Wasser
 Zusammenfassung aller Ergebnisse

Zusatz (ng)	0,2	0,5	1,0
Wiederfindung	0,217	0,772	1,055
in (ng)	0,217	0,464	1,000
	0,257	0,500	0,824
	0,174	0,637	0,865
	0,232	0,335	0,970
	0,195	0,586	1,052
	0,193	0,472	1,040
	0,203	0,689	1,036
	0,181	0,427	0,987
	0,250	0,468	1,069
	0,328	0,481	1,020
	0,182	0,463	1,109
	0,195	0,462	1,042
	0,215	0,512	1,007
	0,267	0,436	1,132
		0,531	

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut meinen besonderen Dank sagen.

Insbesondere danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Bernd Hoffmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

9. Lebenslauf

Am 1. 9. 1946 wurde ich, Karl Hans Heinritzi, als Sohn des Kaufmanns Karl Heinritzi und seiner Ehefrau Franziska Heinritzi in Freising geboren.

Nach vier Volksschuljahren in Freising trat ich 1957 in das Dom-Gymnasium in Freising ein, wechselte 1959 in das Camerloher-Gymnasium, Freising über und bestand im Juli 1967 das Abitur am Anton Bruckner Gymnasium, Straubing.

Im Wintersemester 1967/68 schrieb ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Studium der Tiermedizin ein. Im November 1972 schloß ich diese Fachrichtung mit der Tierärztlichen Prüfung ab.

Von Anfang Februar 1973 bis Ende März 1974 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan.

In dieser Zeit fertigte ich die vorliegende Dissertation an.

